

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1938-1939 — N° 298

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
SUR LES
PROTÉIDES DU SÉRUM SANGUIN

COMPARAISON DES TECHNIQUES DE SÉPARATION ET DE DOSAGE
DES ALBUMINES, DES GLOBULINES, DES EUGLOBULINES
ET DES PSEUDOGLOBULINES

CONSIDÉRATIONS SUR LA DÉFINITION
DE CES FRACTIONS PROTÉIDIQUES

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « PHARMACIE »

Présentée et soutenue publiquement le Samedi 6 Mai 1939

PAR

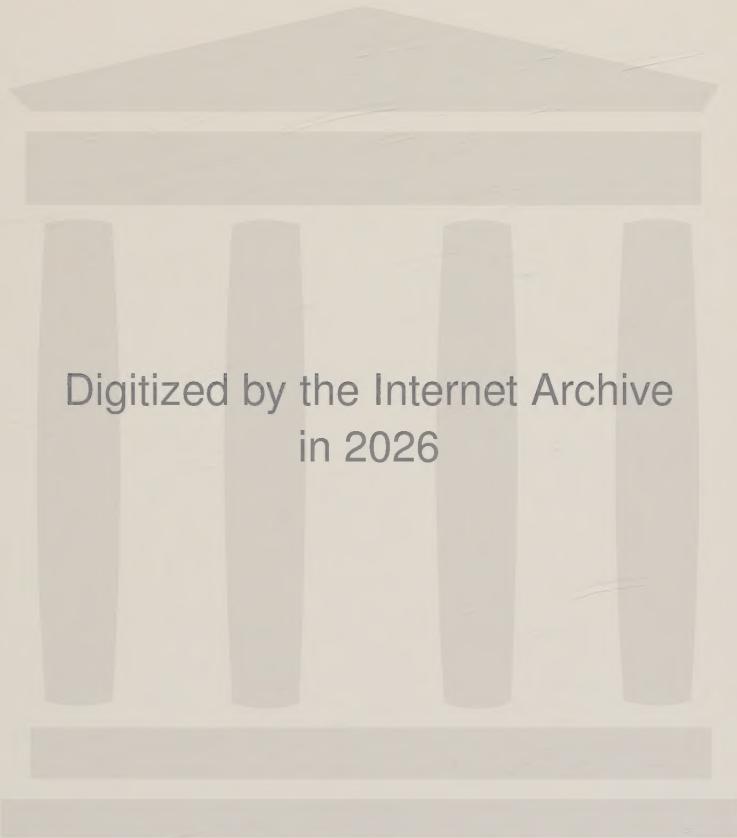
Victor-Michel BATTUT

Né à Messeix (Puy-de-Dôme), le 14 Octobre 1884

Examinateurs de la Thèse	{	MM. MACHEBŒUF, professeur.....	Président
		CHELLE, professeur.....	Juges
		LABAT, professeur.....	
		DE GRAILLY, agrégé.....	

PARIS
IMPRIMERIE A. MUNIER
20 bis, RUE JONQUOY, 20 bis

1939



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1938-1939 - N° 298

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
SUR LES
PROTÉIDES DU SÉRUM SANGUIN

COMPARAISON DES TECHNIQUES DE SÉPARATION ET DE DOSAGE
DES ALBUMINES, DES GLOBULINES, DES EUGLOBULINES
ET DES PSEUDOGLOBULINES

CONSIDÉRATIONS SUR LA DÉFINITION
DE CES FRACTIONS PROTÉIDIQUES

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « PHARMACIE »

Présentée et soutenue publiquement le Samedi 6 Mai 1939

PAR

Victor-Michel BATTUT

Né à Messeix (Puy-de-Dôme), le 14 Octobre 1884

Examineurs de la Thèse	{	MM. MACHEBŒUF, professeur.....	<i>Président</i>
		CHELLE, professeur.....	<i>Juges</i>
		LABAT, professeur.....	
		DE GRAILLY, agrégé.....	

PARIS
IMPRIMERIE A. MUNIER
20 bis, RUE JONQUOY, 20 bis

1939

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. MAURIAC. — ASSESSEUR : M. LABAT
DOYEN HONORAIRE : M. C. SIGALAS

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. POUSSON, MOURE, BARTHE, DENIGÈS, BEILLE, CASSAËT,
 CHAVANNAZ, C. SIGALAS, SABRAZÈS, BÉGOUIN, DUPOUY.

PROFESSEURS :

MM.	MM.
Clinique médicale { MAURIAC	Physiologie..... FABRE
Clinique chirurgicale et gynécologique... { DUPÉRIÉ	Clinique ophtalmologique . . . TEULIÈRES
Clinique chirurgicale GUYOT	Clinique chirurgicale infan-
Pathologie et thérapeutique générales... PAPIN	tile et orthopédie ROCHER
Clinique d'accouchements.. CARLES	Clinique médicale des mala-
Anatomie pathologique et ANDÉRODIAS	dies des enfants CRUCHET
microscopie clinique DAMADE	Chimie biologique et médicale..... MACHEBŒUF
Anatomie VILLEMIN	Physique médicale et pharmaceutique . . . WANGERMEZ
Anatomie générale et histologie G. DUBREUIL	Médecine coloniale et Clini-
Hygiène LEURET	que des maladies exotiques BONNIN
Médecine légale et déontologie LANDE	Clinique des maladies cuta-
Electroradiologie et clinique d'électricité médicale RÉCHOU	nées et syphilitiques..... PETGES
Chimie CHELLE	Clinique des maladies des
Botanique et matière médicale GOLSE	voies urinaires..... DUVERGEY
Pharmacie VITTE	Clinique des maladies nerveuses et mentales ABADIE
Zoologie et parasitologie ... MANDOUL	Clinique d'oto-rhino-laryngologie PORTMANN
Médecine expérimentale ... AUBERTIN	Toxicologie et hygiène appliquée LABAT
	Hydrologie thérapeutique et
	Climatologie CREYX
	Clinique odonto-stomatologique..... DUBECQ

MM. LACOSTE (Histologie), PERY (Obstétrique), PERRENS (Maladies mentales),
 R. SIGALAS (Parasitologie et sciences naturelles), JEANNENEY (Chirurgie générale).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.	MM.
Anatomie..... { N...	Chirurgie générale { CHARRIER
Physiologie... DUFOUR	LOUBAT
	MASSÉ
	DARGET
	N...
	Obstétrique RIVIÈRE
	Ophtalmologie BEAUVIEUX
	Oto-rhino-laryngologie DESPONS
	Dermatologie et syphilogra-
	phie JOULIA
	Physique médicale N...
	Chimie générale pharmaceut. et toxicologie. N...



COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	MM.
Médecine opératoire JEANNENEY	Ophtalmologie..... CABANNES (en congé)
Accouchements RIVIÈRE	Physique médicale et pharmaceutique. AURIAC
Pathologie médicale DELMAS-MARSALET	Anatomie..... J. BEAUVIEUX
Puériculture FAUGÈRE	Chimie minérale CASTAGNOU
Zoologie et parasitologie ... R. SIGALAS	Botanique GIRARD
Médecine légale DERVILLÉE	Pharmacie galénique ... MESNARD
Urologie DARGET	Bactériologie MOUREAU
Législation pharmaceutique POPLAWSKI	Physiologie PETITEAU
Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes..... N...	

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MACHEBOEUF

Docteur en Médecine, Docteur ès-Sciences.
Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de Bordeaux.
Chevalier de la Légion d'Honneur.

*Qui nous a inspiré le sujet de ce travail, puis
nous a prodigué ses conseils éclairés et ses
judicieuses critiques.*

Hommage de profonde reconnaissance.

A MES JUGES

A MONSIEUR FRANCIS TAYEAU

Pharmacien, Docteur ès-Sciences.
Préparateur de Chimie Biologique à la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de Bordeaux.

*Qui a souvent mis à notre disposition les
ressources de son habileté technique pour nous
aider dans la réalisation de nos expériences.*

Hommage de reconnaissance.

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A MES COLLABORATEURS
DES LABORATOIRES SAUBA

INTRODUCTION

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LES PROTÉIDES DU SÉRUM SANGUIN DE L'HOMME ET DES MAMMIFÈRES

Le sérum sanguin d'un homme adulte normal contient de 90 à 95 grammes de protéides par litre, autant donc que certains tissus qui, cependant, ne sont pas liquides comme le sérum. Cette richesse en protéides a depuis longtemps attiré l'attention des biologistes et des physicochimistes qui ont trouvé dans le sérum une matière première de choix pour l'étude des protéides. Le sérum, en effet, est un liquide homogène que l'on peut se procurer facilement et dans lequel les protéides sont en solution aqueuse sans qu'aucune manipulation préalable soit nécessaire pour les dissoudre. L'étude des protéides tissulaires nécessite au contraire une mise en solution préalable, donc la mise en œuvre d'artifices qui peuvent altérer les protéides, substances éminemment fragiles.

Bien plus, des études déjà anciennes ont montré que la teneur du sérum en protéides variait considérablement au cours de diverses maladies et les cliniciens se sont vivement intéressés à l'étude de ces variations. Le problème est fort complexe car le sérum ne contient pas un unique protéide, mais plusieurs protéides très différents qu'il est difficile de séparer d'une façon précise et dont la définition même soulève de délicats problèmes. On n'est d'ailleurs pas encore parvenu à isoler du sérum une espèce chimique protéidique parfaitement caractérisée.

GLOBULINES ET ALBUMINES

Depuis longtemps déjà on a noté que le sérum contient des protéides de plusieurs types présentant entre eux des différences dans leurs caractères de solubilité. Dès 1851, PANUM (1) nota que la simple dilution du sérum par de l'eau distillée ou par de l'eau légèrement acidulée par de l'acide acétique provoque la précipitation d'une partie des protéides du sérum, mais laisse une autre partie des protéides en solution. Onze années plus tard, en 1862, A. SCHMIDT (2) constata que si l'on dissolvait dans le sérum du chlorure de sodium jusqu'à saturation, il précipitait une partie des protéides et une partie seulement, il appela « *globuline* » la fraction protéidique qui précipite dans ces conditions et il la considéra comme à peu près identique à la fraction dont PANUM avait montré l'insolubilité dans l'eau distillée acidulée.

TH. WEYL, élève d'HOPPE-SEYLER (3), vérifia les travaux de PANUM et proposa de remplacer l'acide acétique par du gaz carbonique pour précipiter la « Globuline » du sérum. Mais, en 1902, HAMMARSTEN (4) montra que la simple insolubilité dans l'eau distillée ou dans l'eau distillée acidulée ne suffisait pas à une définition précise d'une fraction bien caractérisée, car la quantité de « Globuline » obtenue par les techniques de PANUM et de WEYL dépend grandement des conditions expérimentales. Si, au lieu de diluer le sérum par de l'eau distillée on lui enlève les sels par dialyse, les protéides qui précipitent ne sont pas en même proportion.

(1) PANUM. *Virchow. Archiv.*, 3, 1, 251 (1851).

(2) SCHMIDT A., *Reichters und Du Bois. Raymonds Archiv* (1862).
(Cité d'après Sandor thèse sciences Paris 1934.)

(3) WEYL Th., *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, I, 72 (1877).

(4) HAMMARSTEN O., *Ergebnisse des Physiologie*, I, 330 (1902).

Dès 1888, l'école de HOFMEISTER avait abordé l'étude systématique (5) du fractionnement des protéides du sérum sanguin.

HOFMEISTER constata que le sulfate d'ammonium, sel très soluble dans l'eau, provoque, lorsqu'on le dissout en quantité suffisante dans le sérum, la précipitation de protéides.

Si l'on sature le sérum en sulfate d'ammonium, tous les protéides précipitent. Si, au contraire, la concentration du sulfate d'ammonium est moindre, une partie seulement des protéides est insolubilisée. HOFMEISTER étudia les modalités de cette précipitation en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium, puis il utilisa ce sel pour fractionner les protéides du sérum. Si l'on ajoute progressivement du sulfate d'ammonium à du sérum, on constate que le précipité protéidique augmente tout d'abord rapidement au fur et à mesure de l'addition de nouvelles quantités de sel, mais ensuite l'augmentation du précipité cesse pendant un temps pour ne reprendre que lorsque l'on ajoute beaucoup plus de sel. Il existe un terme, un palier, très net correspondant à peu près à une quantité de sel égale à la moitié de la quantité nécessaire à la saturation du liquide en sulfate d'ammonium. Lorsque l'on est arrivé à ce palier, si l'on ajoute un peu plus de sulfate, le précipité n'augmente plus; il faut en ajouter beaucoup plus pour qu'un nouveau précipité apparaisse. Pour que tous les protéides soient enfin précipités, il faut ajouter beaucoup de sulfate d'ammonium et parvenir à la saturation du liquide. Il existe en somme, au voisinage de la demi-saturation en sulfate d'ammonium, un palier qui différencie

(5) HOFMEISTER, *Fr. Arch. f. exp. Path. und Pharm.*, 20 à 28 (1886 à 1890).

deux fractions protéidiques que l'on étudia séparément et qui se montrèrent différentes (KAUDER) (6).

L'action du sulfate d'ammonium ne semblait pas modifier les protéides qui se remettaient rapidement en solution si par une dilution convenable ou par dialyse on faisait diminuer la concentration en sel. Le fractionnement des protéides par le sulfate d'ammonium apparut donc comme une méthode idéale; elle fut d'ailleurs très féconde et c'est sur elle que sont basés les plus beaux travaux modernes sur les protéides du sérum, mais l'école de HOFMEISTER eut malheureusement le grand tort d'utiliser pour dénommer la fraction protéidique précipitant par demi-saturation en sulfate d'ammonium le terme « globuline » que SCHMIDT avait créé pour désigner les protéides précipitant par dilution du sérum au moyen d'eau distillée acidulée. C'était faire une erreur de nomenclature grave basée sur une pétition de principe, puisque c'était admettre l'identité de deux fractions protéidiques obtenues par des techniques très différentes et ne se correspondant pas, ni du point de vue quantitatif, ni du point de vue qualitatif. Une confusion extrême fut la conséquence de cette erreur puisque les divers auteurs qui, par la suite, parlèrent de « globulines » ne se référaient pas à une même fraction. Nous verrons dans la partie expérimentale de cette thèse combien sont différents les résultats que l'on obtient lorsque l'on utilise pour un même sérum la technique d'HOFMEISTER ou la technique de PANUM et SCHMIDT.

Si l'on parcourt les revues médicales, on rencontre au sujet des globulines du sérum des contradictions nombreuses, car certains auteurs appellent encore globulines les protéides précipitant par dialyse ou par

(6) Arch. f. exp. Path. und Pharm., 20, 411 (1886).

dilution du sérum au moyen d'eau distillée, tandis que d'autres auteurs appellent globulines les protéides précipitant par dilution du sérum au moyen d'eau acidulée et tandis que d'autres auteurs enfin appellent globulines les protéides précipitant en présence de sulfate d'ammonium en quantité suffisante pour que le liquide soit demi-saturé en ce sel. De nombreux auteurs n'ont pas noté les différences fondamentales entre ces trois techniques et ils ont considéré comme comparables les résultats expérimentaux obtenus par l'une d'elles et ceux obtenus par l'une quelconque des autres.

Cependant HAMMARSTEN, dès 1902, montra qu'il y avait discordance entre les diverses méthodes de précipitation proposées pour définir le terme « globulines »; il montra en particulier le fait curieux suivant que nous avons pu vérifier. Si l'on soumet un sérum à la dialyse, on obtient une fraction (globulines selon SCHMIDT) qui est moins abondante que si l'on soumet à la dialyse des globulines préalablement séparées par la méthode de HOFMEISTER-KAUDER au sulfate d'ammonium demi-saturé. Puisque la dialyse ne donne pas des résultats constants, HAMMARSTEN considéra donc que les seules propriétés utilisables pour la définition des protéides sériques étaient leur précipitabilité par le sulfate d'ammonium à concentration convenable. Il proposa d'appeler *globulines* les protéides précipitant par le sulfate d'ammonium à demi-saturation (ou ce qui semble revenir à peu près au même par le sulfate de magnésium à saturation). Il réserva le terme *albumines* aux protéides qui ne précipitent pas par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, mais précipitent par le sulfate d'ammonium à saturation.

FRACTIONNEMENT DES GLOBULINES :
« EUGLOBULINES » ET « PSEUDOGLOBULINES »

Quelques années avant les travaux d'HAMMARSTEN, MARCUS EMIL (7) avait constaté déjà la discordance entre la précipitation par dialyse et la précipitation par le sulfate d'ammonium à demi-saturation; il avait même montré que le sérum débarrassé par dialyse des fractions insolubles dans l'eau distillée donne encore un très abondant précipité si on ajoute au liquide du sulfate d'ammonium en quantité correspondante à la demi-saturation. MARCUS EMIL admit que les « globulines » solubles dans l'eau distillée devaient être différenciées de celles précipitant par dialyse et il proposa pour désigner ces deux fractions dont l'ensemble correspondait aux globulines d'HOFMEISTER les termes « *euglobulines* » et « *pseudoglobulines* ».

« *Euglobulines* » correspondant à la fraction précipitant par dialyse et « *pseudoglobulines* » à la fraction ne précipitant pas par dialyse, mais précipitant par demi-saturation en sulfate d'ammonium.

Si l'on s'en était tenu aux définitions d'HOFMEISTER et de MARCUS EMIL, toute confusion grave aurait été évitée, bien que, comme nous le verrons et comme l'avait déjà noté HAMMARSTEN, la précipitation par dialyse des euglobulines ne donne pas un résultat identique si l'on fait varier les conditions de la dialyse. Mais divers auteurs, et en particulier SPIRO, PORGES et FULD (8 et 9), cherchèrent à éviter la dialyse pour le fractionnement des globulines et voulurent, par extension de la méthode d'HOFMEISTER, chercher à séparer

(7) MARCUS EMIL, *Zeitschr. f. physiol., Chem.* 28, 559 (1899).

(8) PORGES et SPIRO, *Beitr. z. Chem. Physiol. u. Path.*, 3, 277 (1903).

(9) FULD et SPIRO, *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 31, 132 (1900).

les euglobulines des pseudoglobulines en les précipitant séparément par des concentrations convenables en sulfate d'ammonium.

Pour cela, ces auteurs cherchèrent une concentration critique en sulfate d'ammonium pour laquelle seraient précipitées les euglobulines sans que soient précipitées les pseudoglobulines. Leurs résultats expérimentaux ne furent pas très concluants, car ils ne purent pas mettre en évidence une zone critique nette de concentration en sulfate d'ammonium, mais, malgré tout, ces auteurs attribuèrent le nom de « euglobulines » aux globulines précipitant lorsque la concentration en sulfate d'ammonium correspondait au tiers de saturation en ce sel. Ils appelèrent « pseudoglobulines » les globulines ne précipitant pas dans ces conditions. Un examen critique des faits expérimentaux aurait cependant montré, comme nous le verrons dans la partie expérimentale de cette thèse, que le précipité obtenu par tiers de saturation en sulfate d'ammonium ne correspond ni quantitativement, ni qualitativement aux euglobulines obtenues par dialyse selon MARCUS EMIL. Un nouveau motif de confusion fut la conséquence des travaux de FULD, PORGES et SPIRO et ce motif fut d'autant plus souvent la cause de confusion que les immunologistes avaient eu leur intérêt vivement éveillé sur les euglobulines par les travaux de SENG (10). Cet auteur, en effet, montra que les anticorps du sérum antidiptérique ne précipitent pas avec les euglobulines lors de la dialyse du sérum, mais précipitent avec les pseudoglobulines lorsque, après la dialyse, on ajoute du sulfate d'ammonium en quantité correspondant à la demi-saturation du liquide. De nombreux auteurs cherchant à purifier les sérums thérapeutiques ou à concentrer les anticorps ont

(10) SENG W., *Zeitschr. f. Hyg. und Infekt.* 31, 513 (1899).

utilisé cette observation de SENG, mais tandis que certains, pour éliminer les euglobulines, utilisaient la dialyse, d'autres utilisaient le sulfate d'ammonium en se basant sur les recherches de FULD, PORGES et SPIRO.

Les résultats furent, malgré tout, assez concordants si bien que l'on oublia que les deux techniques ne donnaient pas pour des recherches autres que la précipitation des anticorps des résultats comparables, et l'on continua appeler indifféremment *euglobulines* les protéides précipitant par dialyse du sérum ou ceux précipitant par tiers de saturation en sulfate d'ammonium ou même ceux obtenus en soumettant à la dialyse l'ensemble des globulines préalablement précipitées par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

S'il ne s'était toujours agi que de concentrer les anticorps des sérums thérapeutiques dans une fraction protéidique, les discordances n'auraient pas été fondamentales, mais les cliniciens s'intéressèrent naturellement aux variations quantitatives des protéides sériques chez leurs malades et quelques faits très intéressants furent mis en évidence à ce sujet (variations du rapport albumines-globulines dans la néphrose lipoïdique et dans la cirrhose atrophique type Laennec; variations du rapport euglobulines-pseudoglobulines dans le Kala-Azar et dans le paludisme, etc.). Malheureusement, les cliniciens adoptèrent chacun, à peu près au hasard, l'une ou l'autre des techniques de séparation des globulines, des euglobulines et des pseudoglobulines qu'ils trouvèrent dans la littérature biochimique et ce que les uns appelèrent globulines (selon SCHMIDT par exemple), n'était pour les autres que les euglobulines (selon MARCUS EMIL par exemple); ce que les uns appelaient globulines (selon HOFMEISTER) ne correspondait pas du tout à ce que les autres appelaient également globulines (selon

SCHMIDT) et même ceux qui utilisaient un seul et même terme « euglobulines » ne parlaient pas d'une même fraction suivant qu'ils entendaient ce terme comme SPIRO ou comme MARCUS EMIL.

Si l'on parcourt dans les revues médicales les articles se rapportant à ce sujet, on est frappé de considérables discordances entre les résultats donnés par les auteurs. M. le Professeur MACHEBOEUF a bien voulu nous associer aux recherches qu'il était chargé d'effectuer à ce sujet par la commission de nomenclature des protéides du sérum que la Société de chimie biologique décida de créer pour unifier les techniques et les définitions et pour éviter les confusions au sujet des euglobulines, des pseudoglobulines, des globulines et des albumines du sérum.

C'est l'ensemble des essais que nous avons effectués dans ce but qui fait l'objet de la présente thèse. Mais, avant d'aborder l'exposé de nos expériences, nous devons rappeler brièvement l'essentiel des faits connus sur la fraction protéidique du sérum qui n'est pas précipitable par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, c'est-à-dire sur les albumines.

ALBUMINES DU SÉRUM

Au sujet des albumines, les confusions sont moins fréquentes que pour les globulines, car la définition d'aucune sous-fraction comparable aux euglobulines ou aux pseudoglobulines ne fut faite avec assez de précision pour qu'elle suscite l'intérêt des cliniciens. Les quelques discordances que l'on rencontre dans la littérature médicale au sujet des teneurs du sérum en albumines ont seulement comme origine les discordances entre les techniques de précipitation des globulines dont nous avons déjà parlé. En effet, ceux qui appellent globulines les globulines précipitant par

dialyse ou par dilution du sérum comme le faisait autrefois PANUM, considèrent que les pseudoglobulines sont des albumines et les dosages d'albumines qu'ils effectuent sont ainsi entachés d'une forte erreur par excès.

On a d'ailleurs cherché à fractionner les albumines comme on chercha à fractionner les globulines, mais dans ce cas la dialyse est inopérante puisque, par définition même, toutes les albumines sont solubles dans l'eau en l'absence de sels.

On a donc cherché surtout à séparer des fractions albuminiques en effectuant des précipitations fractionnées par augmentation progressive de la concentration en sulfate d'ammonium. Aucun palier net, aucune zone critique précise n'existe dans les courbes de précipitation en fonction de la concentration saline qu'ont pu tracer les auteurs. (OPPENHEIMER (11) et DOERR et BERGER (12)).

On admit cependant qu'il devait exister deux fractions distinctes dans les albumines du sérum (ROBERTSON) (13), car, lorsque l'on fait cristalliser la sérum albumine, il reste une fraction assez importante qui ne cristallise pas.

Une fraction très bien différenciée a pu être récemment séparée des albumines par MACHEBOEUF (14), mais il ne s'agit ici que d'une fraction dont la masse est assez faible vis-à-vis de l'ensemble des albumines et, de plus, il ne s'agit pas de protéides libres mais de cénapses lipidoprotéïdiques formées par l'union de

(11) OPPENHEIMER, *Ver. d. Berlin. physiol. Gesel.* (1902), cité d'après Sandor thèse sciences Paris 1934.

(12) DOERR et BERGER, *Biochem. Zeitsch.* 131, 13 (1922).

(13) ROBERTSON, *Journ. of biol. chem.* 13, 325 (1913).

(14) MACHEBOEUF, *Bull. Soc. Chim. biol.* 11, 268 et 485 (1929), puis *ibid.* 19, 694 (1937).

lipides avec des albumines. MACHEBOËUF a pu montrer que les protéïdes qui entrent dans la constitution de ces cénapses ne sont pas différenciables d'avec les autres albumines du sérum; elles se rassemblent dans cette fraction uniquement par suite des propriétés de solubilité particulières que leur confèrent les lipides qui leur sont accolés. Ces cénapses, que l'on désigne habituellement par le terme « cénapses acidoprécipitables de MACHEBOËUF » ne doivent donc pas être éliminées des albumines lorsque l'on effectue un dosage des albumines du sérum. L'intérêt des cénapses acidoprécipitables est peut-être grand en clinique, mais les recherches à ce sujet sont à peine ébauchées et nous cherchions surtout à étudier les techniques de dosage et la définition même des divers protéïdes du sérum; nous n'avons pas étendu nos essais à la séparation des diverses cénapses que peuvent former les divers protéïdes en s'unissant aux lipides dans le sérum.

Notons cependant que toutes les fractions protéïdiques que l'on peut obtenir en traitant le sérum par de l'eau distillée, par de l'eau acidulée ou par des sels neutres ne contiennent pas que des protéïdes, mais elles contiennent aussi des lipides. Le sérum normal de l'homme contient environ 7 à 8 grammes de lipides par litre et chacune des fractions protéïdiques entraîne avec elle une partie de ces lipides qui leur sont liés sous forme de cénapses lipidoprotéïdiques (15). Si donc on désire doser les protéïdes contenus dans les diverses fractions que l'on sépare du sérum, il est nécessaire de mettre en œuvre une technique dans laquelle des lipides présents n'apportent pas d'erreur. Si l'on veut, par exemple, peser les protéïdes, il faut au

(15) MACHEBOËUF, *L'état des lipides de la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique*. 1 vol., Paris 1937. Hermann, éditeur.

préalable les dégraisser en les coagulant au moyen d'alcool bouillant, puis en les épuisant à plusieurs reprises par de l'alcool chaud et par de l'éther. (Il faut évidemment éliminer aussi les sels qui ont servi à précipiter les fractions protéidiques et, pour cela, il faut finalement laver le coagulum par de l'eau chaude avant de le dessécher pour le peser).

Ces opérations assez complexes de purification des protéides avant leur pesée ont conduit divers auteurs à proposer pour le dosage des diverses fractions protéidiques des techniques plus rapides. Certains ont cherché à éviter la pesée et la délipidation en effectuant simplement le dosage de l'azote dans les fractions protéidiques, puis en calculant d'après les quantités d'azote trouvées les quantités de protéides. Une telle technique est judicieuse, mais à condition que les réactifs utilisés pour la précipitation des fractions protéidiques ne contiennent pas d'azote. On chercha donc à substituer au sulfate d'ammonium un sel non azoté et HOWE (16) proposa l'usage du sulfate de sodium pour la séparation des globulines et des albumines, mais les conditions dans lesquelles doit être effectuée cette séparation sont assez difficilement réalisées avec exactitude et cette technique ne donne des résultats constants que lorsque l'opérateur est bien entraîné et dispose du matériel approprié. De plus, introduire le sulfate de sodium dans la définition des globulines ou des euglobulines était introduire une nouvelle source possible de confusion, car rien ne prouvait que les fractions précipitées par ce sel étaient rigoureusement les mêmes que celles précipitées par le sulfate d'ammonium et nous avons vu combien il était dangereux d'attribuer une même dénomination à des fractions protéidiques isolées par des techniques dissemblables.

(16) HOWE P.E., *The journ. of biol. chem.*, 49, 93 (1921).

Il semble bien que les globulines de HOWE correspondent à très peu près aux globulines précipitant à demi-saturation en sulfate d'ammonium, mais rien ne prouve encore que la similitude ne soit pas seulement quantitative et non qualitative. D'ailleurs rien ne prouve également que la similitude persiste dans les sérums de malades. On ne conçoit, d'autre part, pas l'aversion qu'ont certains travailleurs des laboratoires médicaux pour les pesées; il semble cependant qu'il soit plus pénible d'effectuer un microdosage d'azote que de faire une simple pesée comportant une précision égale tout au plus au demi-milligramme. Et, d'ailleurs, pour calculer à partir d'un microdosage d'azote la quantité de protéides présents dans une fraction, il est nécessaire de faire intervenir un coefficient basé sur la teneur en azote des protéides; ce coefficient n'est pas le même pour les diverses fractions protéidiques et il peut peut-être varier pour certains sérums pathologiques. Nous avons donc systématiquement éliminé de la série de nos essais la technique de HOWE qui ne répond pas à un besoin réel des cliniciens et nous avons voulu, pour éliminer toute influence perturbatrice possible de la technique de dosage des protéides dans nos fractions, utiliser constamment une même technique, la plus sûre, la méthode pondérale. Toutes les fractions protéidiques que nous avons étudiées furent coagulées par de l'alcool bouillant, puis traitées par de l'éther tiède, puis encore une fois par de l'alcool, puis, finalement, par de l'eau chaude. Tous ces lavages furent effectués dans un tube à centrifuger préalablement taré à la balance de précision. Après chaque lavage, le coagulum était séparé de la solution de lavage par décantation après centrifugation. Finalement, le tube et le coagulum étaient placés dans une étuve à 105° pendant 12 à 15 heures, puis dans un dessiccateur à

vide et à anhydride phosphorique jusqu'à constance du poids.

Le chiffre que nous obtenions correspondait ainsi directement aux protéides eux-mêmes, bien débarrassés des lipides et des autres substances solubles dans l'alcool, dans l'éther ou dans l'eau. Cette technique, qui est en somme celle utilisée couramment dans le laboratoire du Professeur MACHEBOËUF, est applicable sans erreur à toutes les fractions protéidiques, quelque soit le procédé qui a servi à les obtenir : dialyse, précipitation par les sels ou simple dilution du sérum par de l'eau acidulée. Nous avons, dans des essais préliminaires, vérifié sa fidélité en pratiquant une série de déterminations parallèles sur divers échantillons d'une même solution protéidique. Nous avons d'ailleurs rapidement constaté que si l'on a à sa disposition une simple balance sensible au dixième de milligramme, il suffit pour que l'erreur soit inférieure à celle correspondant à un dosage d'azote que la quantité de protéides pesée soit au moins égale à 10 milligrammes et puisque le sérum contient de 40 à 60 grammes d'albumines et de 35 à 50 grammes de globulines totales par litre, on pourrait, à la rigueur, opérer avec une grande précision sur un seul centimètre cube de sérum. La précision de la pesée dépasse grandement la fidélité des méthodes d'obtention des diverses fractions protéidiques.

Un autre avantage de la technique pondérale que nous avons adoptée est de permettre la détermination des lipides qui étaient présents dans chaque fraction, car ces lipides sont contenus dans les solutions alcooliques et éthérées que l'on obtient en lavant les protéides. Nous avons, dans chaque cas, évaporé ces solutions par distillation dans le vide, puis repris le résidu par de l'éther et de l'eau que nous avons agités ensemble puis placés dans une boule à décantation. L'éther

qui avait dissous les lipides fut séparé par décantation de l'eau qui avait dissous des sels et des substances non lipidiques. L'éther fut évaporé dans une fiole de FOURNEAU tarée et les lipides qui restaient comme résidus de cette évaporation furent pesés après dessiccation dans le vide en présence d'anhydride phosphorique. Nous avons ainsi pu déterminer l'erreur qui aurait été commise dans chaque cas si l'on avait pesé les fractions protéidiques sans en éliminer les lipides. Ces erreurs, nous le verrons, sont importantes, même dans les sérums normaux; elles seraient considérables si l'on avait affaire à des sérums très riches en lipides comme ceux des malades atteints de néphrose lipoïdique par exemple. (L'erreur dans ce cas pourrait, pour certaines fractions, atteindre 90 pour 100.)

Notons enfin que certains cliniciens désirant trouver une technique d'exécution très rapide et ne demandant pas de manipulations soigneuses ont cherché à se renseigner sur la constitution protéidique des sérums de leurs malades en déterminant simplement une propriété physique du sérum dépendant plus ou moins directement de la teneur du sérum en protéides. On utilisa par exemple la mesure de l'indice de réfraction du sérum pour déduire les teneurs en protéides grâce à des tables ou à des abaques qui étaient prétendues donner la constitution protéidique du sérum en fonction de son indice de réfraction. Les résultats obtenus ainsi ne sont pas trop mauvais lorsqu'il s'agit de sérums à peu près normaux, mais pour les sérums de malades lipémiques, par exemple, l'indice de réfraction est fortement influencé par les lipides présents dans le sérum et les résultats sont complètement faux. Nous n'avons donc pas eu besoin de poursuivre plus avant l'étude des techniques de ce genre.

PARTIE EXPERIMENTALE

COMPARAISON DES DIVERSES TECHNIQUES DE SÉPARATION DES DIVERSES FRACTIONS PROTÉIDIQUES DU SÉRUM SANGUIN

Nous avons comparé entre elles les diverses techniques de précipitation des fractions appelées suivant les auteurs « globulines » ou « euglobulines ». Pour que notre comparaison soit valable, il fallait que toutes ces techniques soient mises en œuvre sur un même sérum. Comme, d'autre part, nous voulions éviter toute erreur pouvant provenir des difficultés de mise en œuvre de certaines de ces techniques (dialyse par exemple) sur de petites quantités de sérum, il nous fallait un volume important du sérum étudié :

Puisque nous voulions en outre effectuer la comparaison en dehors de toute modification pathologique du sérum, nous ne pouvions pas simplement prendre le sérum d'une saignée thérapeutique effectuée sur un malade. Il nous fallait au moins 150 cc. de sérum pour chaque série d'expériences. Nous ne pouvions pas demander à des hommes normaux de nous fournir chaque fois que nous en avions besoin de tels volumes de sérum (350 cc. de sang environ). Aussi, avons-nous opéré sur du sérum de cheval. Les résultats que nous avons obtenus pourront servir de base à des essais comparatifs sur du sérum humain que nous nous proposons de faire à l'avenir, mais les volumes de sérum qui seront alors à notre disposition ne permettront pas des comparaisons aussi rigoureuses que celles que nous rapportons ici pour le sérum de cheval.

Nous avons effectué trois séries d'essais sur trois sérums de chevaux différents provenant d'animaux sains abattus aux abattoirs hippophagiques. Les animaux furent chaque fois autopsiés après abattage pour vérifier qu'ils ne présentaient pas de lésions pathologiques lors de la saignée.

Pour ne pas étendre outre mesure notre exposé, nous ne donnerons que les résultats de deux de nos séries d'essais, les résultats de la troisième série étant en tous points comparables.

DESCRIPTION DES DIVERSES TECHNIQUES QUI ONT ÉTÉ COMPARÉES

TECHNIQUE N° 1

Précipitation de l'ensemble des globulines selon Hofmeister par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

20 cc. de sérum (bien limpide et sans hémolyse) sont mesurés avec précision dans un tube de centrifugeur en verre Pyrex de 60 cc. de capacité. On ajoute lentement en agitant constamment 20 cc. exactement mesurés d'une solution saturée à +15° et neutralisée (ph 7) de sulfate d'ammonium purifié. On continue l'agitation pendant dix minutes, puis on centrifuge à 6.000 tours-minutes pendant quinze minutes. Le liquide surnageant qui contient les albumines selon HOFMEISTER est décanté soigneusement en évitant tout entraînement de précipité. Le culot étant très compact, on peut incliner fortement le tube pour le laisser égoutter pendant une ou deux minutes.

Les globulines sont remises en solution dans une dizaine de centimètres cubes d'eau et c'est sur la solution ainsi obtenue qu'est effectué le dosage pondéral des protéides et des lipides après coagulation des protéides au moyen d'alcool bouillant. Pour cela, on ajoute à la solution quatre volumes d'alcool à 96° puis on agite et l'on plonge le tube dans de l'eau bouillante où on le maintient jusqu'à ce que l'alcool entre en ébullition. On laisse ensuite refroidir, en agitant, pendant une dizaine de minutes. On centrifuge, le liquide surnageant est recueilli par décantation ; il contient une partie des lipides. Le coagulum protéidique est repris par 20 cc. d'alcool ; on agite, puis on porte l'alcool à l'ébullition comme ci-dessus et l'on recueille l'alcool après refroidissement pour le réunir à la première solution alcoolique. Le culot protéidique est à nouveau lavé dans les mêmes conditions par 20 cc. d'alcool que l'on recueille également. Le coagulum protéidique est ensuite traité, toujours dans le tube de centrifugeur, par 20 cc. d'éther que l'on tiédit. Après vingt minutes de contact on recueille l'éther par décantation après centrifugation, puis on effectue un deuxième lavage à l'éther dans les mêmes conditions.

Pour le dosage des lipides, les solutions éthérées sont rassemblées avec les solutions alcooliques déjà recueillies.

Pour éliminer du coagulum protéidique, les sels et les autres substances hydrosolubles qu'il peut contenir, on le traite par un peu d'alcool (5 cc.) et 10 cc. d'eau, l'alcool ayant pour but de permettre la dissolution dans l'eau de l'éther qui imbibait le précipité. On centrifuge pour pouvoir éliminer l'eau alcoolisée par décantation, puis on effectue un deuxième lavage, mais avec de l'eau tiède (20 cc.) qui est également

éliminée après centrifugation. Le coagulum protéidique est enfin prêt à être séché et pesé. Pour en activer la dessiccation, on peut encore le laver avec un peu d'alcool qui en enlève la majeure partie de l'eau d'imbibation, mais ceci n'est pas indispensable. Le tube de centrifugeur avec son contenu est placé dans une étuve à 105-110° pendant 20 heures au moins ; il est alors sorti de l'étuve et placé dans un dessiccateur à vide contenant de l'anhydride phosphorique, où on le laisse une heure avant d'effectuer une première pesée. On le remet ensuite dans le dessiccateur jusqu'au soir ou jusqu'au lendemain matin pour vérifier par une deuxième pesée que son poids n'a pas varié. Le tube de centrifugeur avait été taré vide avec précision ; on déduit donc de la pesée finale la quantité de protéides correspondant aux globulines selon HOFMEISTER dans 20 cc. du sérum étudié.

Pour déterminer les lipides qui étaient accolés aux globulines, l'ensemble des solutions éthérées et alcooliques recueillies ci-dessus est placé dans un ballon de 250 cc. adapté par un rodage à un réfrigérant qui conduit à un deuxième ballon muni d'une tubulure latérale que l'on met en communication avec une trompe à vide. On élève la température du liquide grâce à de l'eau tiédie par une résistance électrique et l'on poursuit la distillation de l'éther, puis de l'alcool, jusqu'à ce qu'il ne reste plus dans le ballon que 3 ou 4 cc. d'eau. On laisse refroidir et l'on verse dans le ballon qui contient les lipides, 20 cc. environ d'éther pur avec lesquels on rince soigneusement les parois du ballon. L'éther est versé dans une boule à décantation et l'on rince à nouveau le ballon avec 10 cc. d'éther ; mais on verse alors dans le ballon une vingtaine de centimètres cubes d'eau distillée qui dissolvent de petites quantités de substances non lipidiques ; on agite énergiquement pour émulsionner

éther et eau, puis on verse l'émulsion dans la boule à décantation que l'on bouche puis que l'on soumet à une agitation assez énergique pendant quelques instants. On laisse ensuite au repos et, après quelques heures, lorsque l'éther et l'eau se sont séparés en deux phases distinctes, on soutire l'eau, puis on verse quantitativement l'éther dans une fiole de Fourneau tarée. On évapore l'éther en plaçant la fiole sur une plaque chauffante électrique tiède. Dès que l'éther est parti on place la fiole dans un dessiccateur à vide contenant de l'anhydride phosphorique. Le lendemain on pèse la fiole et son contenu et l'on en déduit le poids des substances lipoidiques.

TECHNIQUE N° 2

Pécipitation de l'ensemble des globulines par le sulfate d'ammonium selon Hofmeister comme dans la technique N° 1, mais en opérant une redissolution des globulines suivie d'une nouvelle précipitation par le sulfate d'ammonium de façon à purifier les globulines.

Dans la technique N° 1, qui est la plus souvent employée pour la précipitation des globulines dites « totales » ou « globulines selon Hofmeister », le précipité des globulines naît au milieu d'un liquide riche en albumines et ce précipité n'est pas lavé ; il fallait donc penser que des albumines souillaient abondamment les globulines recueillies. Pour préciser l'erreur par excès qui devait résulter de ce fait, nous avons, sous le nom de *Technique N° II*, envisagé une modification de la technique N° 1 dans laquelle les globulines séparées comme dans la technique N° 1 sont ensuite remises en solution dans un peu d'eau puis

précipitées à nouveau par le sulfate d'ammonium à demi-saturation (1).

Lors de cette deuxième précipitation, le précipité de globulines se forme dans une solution qui ne contient comme albumines que la petite quantité qui a pu être entraînée lors de la première précipitation. Il est évident que, dans ces conditions, la quantité d'albumines pouvant encore souiller les globulines doit être infime, mais, comme, d'autre part, les globulines ne sont pas rigoureusement insolubles dans la solution demi-saturée en sulfate d'ammonium, il se peut que de petites pertes de globulines résultent de l'opération de purification à laquelle on soumet en somme les globulines en les précipitant une deuxième fois.

Pour vérifier que la perte de solubilité des globulines dans les conditions où nous opérons est très minime, nous avons, dans un essai particulier, opéré une troisième précipitation des globulines et nous avons constaté que le résultat ainsi obtenu était presque identique à celui obtenu en ne précipitant que deux fois les globulines.

Dans cette technique N° II, comme dans la technique N° I, les globulines furent finalement pesées après coagulation par l'alcool bouillant, lavages à l'alcool, à l'éther puis à l'eau. Les lipides extraits par l'alcool et l'éther furent également pesés.

Nos résultats montrent que l'erreur due à l'entraînement de petites quantités d'albumines dans les globulines lors de leur première précipitation n'est pas considérable ; elle n'atteint pas 8 p. 100.

(1) Cette deuxième précipitation est simplement effectuée en ajoutant à la solution des globulines un volume de solution saturée de sulfate d'ammonium égal au volume de l'eau qui avait servi à dissoudre les globulines.

TECHNIQUE N° 3

Précipitation des « euglobulines » selon Spiro, Porges et Fuld, par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation.

20 cc. du même sérum de cheval sont placés dans un tube de centrifugeur, on ajoute, en agitant, 10 cc. exactement mesurés de la solution saturée neutralisée de sulfate d'ammonium. Après avoir agité pendant dix minutes, on centrifuge. Le précipité recueilli constitue la fraction que SPIRO, PORGES et FULD, nous l'avons vu (8 et 9), considèrent comme les euglobulines.

Ce précipité fut remis en solution dans un petit volume d'eau légèrement salée (9 p. 1000 de Cl Na), puis il fut soumis à la coagulation par de l'alcool chaud et les protéides en furent pesés après lavages à l'alcool, puis à l'éther, puis à l'eau comme dans les techniques précédentes. Les lipides furent également pesés.

TECHNIQUE N° 4

Précipitation des « euglobulines » par simple dilution du sérum au moyen d'eau distillée.

Cette technique est l'une de celles qu'utilisa PANUM (1) qui, le premier, fractionna les protéides du sérum, mais cet auteur utilisait pour dénommer la fraction qu'il obtenait ainsi le terme « sérum-caséine » qu'il avait créé pour désigner également la fraction qui précipite par acidification du sérum dilué. Le terme « sérum-caséine » attribué à deux fractions différentes ne prévalut pas et quelques années plus tard SCHMIDT (2) créa le terme « globulines » pour

désigner la fraction précipitant par dilution de sérum, au moyen d'eau acidulée.

Ici encore un terme unique était utilisé pour désigner deux fractions différentes, mais ce terme eut du succès ; malheureusement, il fut repris par HOFMEISTER (5) qui l'attribua à une troisième fraction : celle obtenue suivant la technique N° I, c'est-à-dire par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. La confusion était grande et elle le devint plus encore lorsque de nombreux auteurs commirent l'erreur nouvelle d'appeler aussi « globulines » la fraction précipitant par simple dilution du sérum au moyen d'eau distillée. C'est probablement en se référant aux anciens travaux de PANUM qu'ils firent cette erreur puisque PANUM avait dénommé d'un même terme « sérum-caséine » ce qui précipitait par dilution simple et ce qui précipitait par dilution et acidification. Nombreux sont encore aujourd'hui les auteurs qui appellent ainsi globulines la fraction précipitant du sérum par simple dilution. Nous avons vu, d'autre part, que MARCUS EMIL (7) et de très nombreux auteurs ont appelé « euglobulines » cette même fraction, mais nous avons vu également que SPIRO, PORGES et FULD (8 et 9) appellent « euglobulines » la fraction précipitant par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation (technique N° III), tandis que d'autres auteurs après MARCUS EMIL appellent également « euglobulines » les protéides précipitant par dialyse directe du sérum (technique N° V) et tandis que d'autres auteurs enfin appellent aussi « euglobulines » la fraction qui précipite lorsque l'on soumet à la dialyse non plus le sérum lui-même, mais les globulines préalablement séparées du sérum au moyen de sulfate d'ammonium à demi-saturation (technique N° VI).

Il était donc important de comparer la fraction obtenue par simple dilution du sérum et qui, suivant

les auteurs, porte le nom de « giobulines » ou le nom d'« euglobulines » avec toutes les autres fractions auxquelles ont été attribuées ces deux dénominations. C'est la technique N° IV qui nous sert à doser les protéides et les lipides de cette fraction.

20 cc. de sérum ont été placés dans une fiole jaugée de 220 cc. et nous avons ajouté de l'eau distillée, tout en agitant, jusqu'au trait de jauge. Après un quart d'heure de repos, nous avons recueilli le précipité formé dans un seul tube de centrifugeur où nous avons fait centrifuger par portions successives, la totalité du liquide. Le précipité fut remis en solution dans 10 cc. d'eau légèrement salée (9 p. 1000 de Cl Na), puis les protéides et les lipides en furent pesés après traitement à l'alcool chaud, puis à l'éther, puis à l'eau, comme pour les autres techniques.

TECHNIQUE N° 5

Précipitation des « euglobulines » par dialyse directe du sérum.

Si l'on soumet du sérum à la dialyse contre de l'eau distillée fréquemment renouvelée, il ne tarde pas à apparaître un précipité qui augmente pendant 36 à 48 heures, suivant les conditions de la dialyse. Ce précipité que de nombreux auteurs appellent les « euglobulines » est par certains encore appelé les « globulines » ; nous l'avons comparé aux autres fractions globuliniques obtenues par les autres méthodes. Voici le protocole de nos expériences de dialyse :

Préparation du dialyseur. — Un tube à essai de 16 millimètres de diamètre nous sert de moule pour les sacs dialyseurs en collodion. Le tube à essai fut tout

d'abord perforé à son fond de façon à permettre le démoulage du sac de collodion sans plissement. Un simple petit orifice de un millimètre environ de diamètre fut réalisé au centre du fond du tube d'essai; les bords de cet orifice furent fondus au chalumeau pour en enlever toutes les aspérités. Le moule ainsi préparé fut soigneusement nettoyé au moyen d'alcool et d'éther, puis séché. On obtura le petit orifice de son fond au moyen d'une gouttelette de collodion que l'on laissa sécher complètement. Le fond du moule fut ensuite plongé de 12 cm. environ dans une solution alcoolo-éthérée de collodion (contenant 6 p. 100 de nitrocellulose dans un mélange d'alcool et d'éther en parties égales). Le moule fut aussitôt sorti du liquide à la vitesse de 1 cm. par seconde environ puis, aussitôt, placé en position horizontale pendant qu'on lui imprimait un mouvement de rotation continue autour de son axe. De cette façon, on obtient à la surface du moule une couche de collodion parfaitement uniforme et d'épaisseur convenable. La rotation du tube fut continuée jusqu'à ce que le collodion ait perdu son éther par évaporation, ce que l'on reconnaît à son odeur. Cette évaporation doit être faite dans une atmosphère aussi sèche que possible et pas trop chaude. Le mieux est de choisir pour préparer les dialyseurs une belle journée sèche et pas trop chaude et d'opérer dans une pièce aérée. Lorsque l'éther est évaporé, on plonge aussitôt le moule et le collodion qui l'entoure dans de l'eau distillée où on le laisse pendant une vingtaine de minutes. L'alcool qui imbibait encore le collodion diffuse dans l'eau, la nitrocellulose coagule en formant une membrane transparente, assez solide, ayant la forme d'un sac qu'il faut maintenant décoller de son moule, sans la déchirer; pour cela on sectionne rapidement avec un canif la partie supérieure du sac qui est toujours trop dure et se détacherait mal; on diminue ainsi, par un trait de canif cir-

culaire, la longueur du sac de 1 cm. environ, puis on empaume le reste du sac et on cherche à lui imprimer un mouvement lent de rotation sur son moule.

Lorsque la rotation est amorcée sur toute la longueur du sac, on souffle un peu dans le tube pour décoller le fond du sac grâce au petit orifice pratiqué dans le fond du moule, puis tout en soufflant encore, et par un mouvement hélicoïdal lent on sort le moule du sac. L'air insufflé entre le moule et le sac par le petit orifice du fond du moule pénètre entre le moule et le sac et permet le décollage du sac sans plissement. Le sac est aussitôt rempli d'eau et immergé dans de l'eau distillée où il doit être conservé jusqu'au jour de l'emploi, car toute dessiccation aurait pour conséquence sa perte irrémédiable. Lorsque l'on veut utiliser le sac pour une dialyse, on l'adapte à l'extrémité d'un tube de verre de même diamètre et long de 15 cm. environ sur lequel on le ligature solidement au moyen d'un fil de lin pas trop mince.

Le tube de verre doit pénétrer dans le sac de 2 cm. environ si bien que le sac, au-dessous de ce tube, présente encore 8 ou 9 cm. de partie libre. Lorsque la ligature est effectuée, on place le sac et son tube support horizontalement, puis, avec un pinceau on déshydrate au moyen d'alcool la partie du sac adhérente au support ainsi que le fil de lin ; on essuie rapidement avec un linge fin l'alcool en excès, puis on place avec un autre pinceau une couche de collodion sur la ligature et sur le tube support. Cette couche, en séchant, rendra la ligature rigoureusement hermétique car elle adhérera à la fois au fil de lin, au tube de verre et à la partie déshydratée du sac de collodion. On laisse sécher deux minutes seulement cette couche de collodion de soudure puis, pour éviter que le sac lui-même se dessèche, on le redresse et on le remplit d'eau jusqu'au niveau inférieur du tube de verre sup-

port et l'on plonge le sac jusqu'au même niveau dans de l'eau. La soudure reste au-dessus de l'eau et termine ainsi rapidement sa dessiccation. Après un quart d'heure le sac est prêt pour l'usage ; on le vide soigneusement de l'eau distillée qu'il contient, puis on y place 20 cc. exactement mesurés de sérum étudié. Le sac est plongé dans de l'eau distillée jusqu'au niveau de sa soudure sur son support, puis le tube support est bouché hermétiquement par un bouchon de caoutchouc qui maintenant à l'intérieur du sac une légère pression qui empêchera l'endosmose de diluer trop notablement le sérum. Le tout est placé dans une glacière ; on change l'eau distillée trois fois par jour pendant quatre jours. Le cinquième jour, on recueille par centrifugation le précipité qui est apparu en ayant soin de bien entraîner au moyen d'un jet de pissette d'eau distillée tout le précipité qui pouvait être adhérent au fond du sac de collodion.

Le précipité rassemblé est dissous dans quelques centimètres cubes d'eau légèrement salée (9 p. 1000 de Cl Na) et soumis à l'action coagulante de l'alcool bouillant afin d'effectuer comme dans les autres techniques le dosage des protéides et des lipides qui ont ainsi précipité par dialyse directe du sérum.

TECHNIQUE N° 6

Précipitation des « euglobulines » par dialyse secondaire des globulines totales préalablement séparées du sérum par la méthode d'Hofmeister au sulfate d'ammonium à demi-saturation.

HAMMARSTEN, nous l'avons vu, avait incidemment noté que l'on n'obtenait pas la précipitation de la même quantité de « globulines » si l'on soumettait à

la dialyse le sérum lui-même ou bien les globulines préalablement précipitées par du sulfate de magnésium à saturation. Cette observation avait passé complètement inaperçue aux nombreux auteurs qui, pour obtenir ce que l'on doit appeler maintenant des « euglobulines », c'est-à-dire des globulines insolubles dans l'eau en l'absence de sels, opéraient indifféremment la dialyse directe du sérum ou la dialyse secondaire des globulines préalablement précipitées par un sel neutre tel que les sulfates de magnésium, d'ammonium ou de sodium. Si l'on parcourt avec soin les mémoires dans lesquels sont rapportés des résultats quantitatifs sur les euglobulines du sérum déterminés par dialyse, on s'aperçoit que là encore existent des contradictions flagrantes et des divergences considérables. Nous avons pensé que ceci pouvait être la conséquence de divergences existant entre les techniques de dialyse. Nous avons donc, dans la technique N° VI, soumis à la dialyse non pas le sérum lui-même, mais les globulines totales obtenues comme dans la technique N° II par précipitation au moyen de sulfate d'ammonium à demi-saturation. La dialyse fut conduite rigoureusement comme dans la technique N° V où nous soumettions le sérum entier à la dialyse. Le dosage des protéides et des lipides dans les euglobulines ainsi obtenues fut effectué comme dans les autres techniques.

Comme nous le verrons en comparant les résultats obtenus pour un même sérum par les diverses techniques, une différence considérable se manifeste entre les résultats des techniques V et VI et ce fait est fort curieux. Il nous conduira à une discussion théorique et il nous permet de comprendre l'ampleur et la fréquence des divergences que l'on rencontre dans la littérature entre les conclusions de divers travaux sur les euglobulines.

TECHNIQUE N° 7

Précipitation des « euglobulines » par dialyse secondaire des « euglobulines » selon PORGES, SPIRO et FULD, obtenues comme dans la technique N° 3 par précipitation au moyen de sulfate d'ammonium au tiers de saturation.

Nous avons vu que PORGES, SPIRO et FULD, et après eux de nombreux biologistes et, en particulier, des immunologistes, appellent « euglobulines » les protéides qui précipitent lorsque l'on ajoute au sérum une quantité de sulfate d'ammonium correspondant au tiers de saturation du mélange en ce sel. Nous avons par la technique N° III étudié les protéides qui précipitent dans ces conditions et nous verrons qu'il n'existe aucun rapport quantitatif entre eux et ce que l'on appelle également « euglobulines », mais que l'on obtient par dialyse ou par dilution du sérum (technique IV et V) ni avec les « euglobulines » obtenues par dialyse secondaire des globulines obtenues selon HOFMEISTER (technique VI).

Puisque les « euglobulines » précipitées selon PORGES, SPIRO et FULD par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation, intéressent tout particulièrement les immunologistes, il était important de savoir si cette fraction contenait effectivement la totalité des « euglobulines » précipitables par dialyse; nous verrons qu'il n'en est rien. Cette fraction ne correspond ni quantitativement ni même qualitativement aux autres fractions appelées comme elle « euglobulines ». Voici comment nous avons opéré pour le démontrer (technique N° VII) : 20 cc. de sérum sont placés dans un tube de centrifugeur. On ajoute, en agitant, 10 cc. de la solution saturée neutralisée de sulfate d'ammonium, comme dans la technique N° III ; après dix minutes, on recueille le précipité par centrifugation ; on élimine l'eau mère avec soin puis le précipité est

remis en solution dans une dizaine de centimètres cubes d'eau légèrement salée (9 p. 1000 de Cl Na). On place la solution dans un sac dialyseur en collodion que l'on plonge dans de l'eau distillée que l'on renouvelle trois fois par jour ; le tout est maintenu à la glacière pendant cinq jours. Le cinquième jour on recueille le précipité apparu et l'on y dose les protéides et les lipides comme dans les autres techniques. Si les euglobulines, selon PORGES, SPIRO et FULD, contenaient toutes les euglobulines, le résultat trouvé ici devrait être identique à celui trouvé par la technique N° III. Nous verrons qu'il n'en est rien.

Si même la dialyse des « euglobulines » de PORGES, SPIRO et FULD donnait un précipité de masse égale à celle du précipité obtenu par dialyse directe du sérum, on pourrait admettre que la précipitation par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation rassemble avec d'autres substances les protéides que la dialyse précipite du sérum (euglobuline de nombreux auteurs), mais nous verrons qu'il n'en est rien non plus.

On se demande par suite de quelle aberration des auteurs comme PORGES, SPIRO et FULD ont pu dénommer « euglobulines » la fraction qu'ils précipitaient par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation et il est regrettable que leur incontestable autorité scientifique ait fait adopter leur technique et leur nomenclature par de nombreux biologistes qui n'ont pas cherché à les vérifier avant de les adopter.

La confusion était déjà grande avant PORGES, SPIRO et FULD par suite de l'attribution du terme « euglobulines » à des fractions assez dissemblables ; elle devait s'accroître à la suite de leurs travaux et de leur attribution du terme « euglobulines » à une nouvelle fraction qui n'avait rien de commun avec aucune des diverses fractions appelées jusqu'alors « euglobulines ».

**COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS
PAR LES SEPT TECHNIQUES
QUE NOUS AVONS MISES EN ŒUVRE
SUR DEUX SÉRUMS DE CHEVAUX NORMAUX**

Dans le tableau ci-contre sont rassemblés les résultats que nous avons obtenus en appliquant simultanément les sept techniques décrites ci-dessus à deux sérums de chevaux normaux.

Nous avons rassemblé dans ce tableau non seulement les résultats correspondant aux protéides, mais aussi ceux correspondant aux lipides qui accompagnaient ces protéides dans les précipités étudiés. On peut ainsi se rendre compte de l'erreur considérable qui aurait résulté de la pesée des précipités sans délipidation préalable. Tous les résultats sont donnés en grammes de protéides ou en grammes de lipides par litre de sérum.

Pour ne pas surcharger le tableau, nous n'y avons fait figurer que les résultats obtenus pour deux sérums de chevaux, mais quelques résultats obtenus pour un troisième sérum de cheval sont venus les confirmer entièrement. Nous ne rapportons pas non plus les résultats de divers essais préliminaires que nous avons effectués au début de notre travail et dans lesquels nous avons simplement comparé deux à deux les diverses techniques entre elles ; ces résultats sont, en effet, moins intéressants que ceux que nous donnons ici et qui correspondent à l'essai sur un même sérum de six techniques à la fois. Nos essais préliminaires avaient d'ailleurs toujours donné des résultats concordant rigoureusement avec ceux qui sont rapportés ici et qui correspondent aux deux séries d'essais définitifs.

TECHNIQUES	SÉRUM N° 1		SÉRUM N° 2	
	Protéides	Lipides	Protéides	Lipides
N° 1 (SO ⁴ (NH ⁴) ² à demi-saturation, une seule précipitation)	52,5	4,0	46,8	2,1
N° 2 (SO ⁴ (NH ⁴) ² à demi-saturation, avec deux précipitations)	48,2	3,8	45,7	2,1
N° 3 (SO ⁴ (NH ⁴) ² au tiers de saturation).	30,6	4,0	36,6	1,5
N° 4 (dilution du sérum)	3,06	0,8	—	—
N° 5 (dialyse directe du sérum)	6,8	0,4	2,43	0,2
N° 6 (dialyse du précipité obtenu selon N° 2)	20,0	—	19,4	1,0
N° 7 (dialyse du précipité obtenu selon N° 3)	—	—	5,2	0,4

Pour vérifier la constance de chacune des techniques lorsqu'on l'applique à un même sérum, nous avons effectué quelques essais dont voici les résultats :

Technique N° 1. — Sérum N° 4.

1 ^{er} essai : protéides trouvés		51,6	grs.
2 ^e essai : — —		51,1	—

Technique N° 4. — Sérum N° 5.

1 ^{er} essai : protéides trouvés		3,50	grs.
2 ^e essai : — —		3,38	—

Technique N° 5. — Sérum N° 6.

1 ^{er} essai : protéides trouvés		5,20	grs.
2 ^e essai : — —		5,15	—

Technique N° 6. — Sérum N° 7.

1 ^{er} essai : protéides trouvés		18,3	grs.
2 ^e essai : — —		17,9	—

La répétition d'une même technique sur deux échantillons d'un même sérum de cheval donne donc toujours, sauf peut-être la technique N° 4 (dilution simple du sérum) des résultats identiques ne différant jamais entre eux de plus de 2 p. 100. Pour la technique N° 4 les deux résultats obtenus pour un même sérum sont assez voisins, ils diffèrent cependant de 4 p. 100 environ.

Si l'on répète une technique donnée pour un même cheval, mais à plusieurs jours d'intervalle, sur du sérum provenant donc de deux saignées différentes, les résultats sont encore parfaitement comparables.

Technique N° 1. — Sérum N° 8.

1 ^{re} saignée	48,5	grs de protéide.
2 ^e saignée 8 jours plus tard	47,0	— —

Technique N° 5. — Sérum N° 8.

1 ^{re} saignée	3,25	grs de protéide.
2 ^e saignée 8 jours plus tard	3,40	— —

DISCUSSION DE NOS RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Les différences considérables que l'on constate pour un même sérum entre les résultats obtenus par les diverses techniques ne peuvent provenir que de la non concordance des méthodes de précipitation des fractions protéidiques puisque, dans chaque cas, les déterminations des lipides et des protéides contenus dans ces fractions furent effectuées par une technique rigoureusement identique (coagulation des protéides par l'alcool bouillant, délipidation au moyen d'alcool chaud et d'éther, lavage à l'eau, puis pesées séparées des protéides secs et des lipides secs).

Il est presque inconcevable que l'on ait pu désigner par un même terme « *globuline* » les deux fractions correspondant aux techniques de précipitations N° I et N° IV dont l'une pèse 17 fois plus que l'autre. Il n'est pas plus concevable que le terme « *euglobulines* » ait été utilisé pour désigner les quatre fractions correspondant aux techniques III, IV, V et VI dont les poids varient de 3 à 30 grammes par litre pour le sérum N° I, et de 2, 4 à 36,6 grammes par litre pour le sérum N° 2.

Lorsque nous avons abordé cette étude, nous pensions bien constater des divergences notables entre les

diverses fractions portant des dénominations identiques, mais nous étions loin de soupçonner une telle incohérence.

Des discussions sans fin sont nées entre les biologistes ou les médecins qui ont étudié les variations physiologiques ou pathologiques des divers protéïdes du sérum ; ces auteurs ne parlaient pas une même langue ; les termes qu'ils utilisaient n'avaient pas une signification commune à tous. Chacun avait foi en une définition des diverses fractions protéïdiques sans l'avoir comparée avec celles de ses interlocuteurs. Aucune de ces discussions ne conduisit à une entente entre les auteurs et l'on continue toujours à voir dans la littérature médicale appeler indifféremment « globulines » les fractions correspondant aux techniques *I* et *IV* ou *V* et « euglobulines » les fractions correspondant aux techniques *III*, *IV*, *V* et *VI*. Le principal résultat des divergences entre les résultats fournis par les auteurs fut de faire naître dans l'esprit des cliniciens un désintéressement progressif de la question des variations pathologiques des protéïdes du sérum. Or, ces variations sont fort intéressantes puisque certaines d'entre elles peuvent étayer fermement des diagnostics délicats tels que ceux de la néphrose lipoïdique, du kala-azar, des cirrhoses atrophiques frustes, etc... Mais pour que les résultats analytiques soient certains et surtout pour que les résultats obtenus dans un laboratoire donné soient utilisables dans tous les autres laboratoires, il fallait unifier les techniques de précipitation et surtout unifier les dénominations des fractions étudiées.

Mais comment choisir une technique et une définition ? Sur quoi se baser pour rejeter les autres techniques et les autres définitions ?

Le problème est d'ailleurs unique puisque choisir une définition pour une fraction protéïdique c'est en

même temps choisir une technique d'obtention, donc de dosage de cette fraction. En effet, toutes les fractions sont simplement définies par les conditions dans lesquelles on les fait précipiter de leur solution.

Aucune divergence notable ne se trouve dans la littérature entre les résultats fournis au sujet des protéides totaux du sérum ; c'est donc que le simple dosage des protéides totaux présents dans un liquide biologique donne toujours des résultats comparables quelle que soit la technique classique que l'on utilise pour réaliser ce dosage : pesée des protéides après coagulation, dosage de l'azote dans le coagulum protéidique obtenu par la chaleur ou par un acide tel que l'acide trichloracétique, dosages néphélométriques ou colorimétriques même sont utilisables s'ils sont convenablement effectués. Les quelques erreurs que l'on peut rencontrer proviennent de la pesée des lipides avec les protéides ou de l'imprécision intrinsèque des techniques néphélométriques et colorimétriques ; ces erreurs qui jamais ne dépassent 10 p. 100 sont inférieures aux variations pathologiques importantes des protéides totaux du sérum. Elles n'auraient pas suffi à désaffecter les cliniciens des études sur les protéides du sérum. C'est donc uniquement à la définition des fractions protéidiques qu'il faut s'attacher.

1° GLOBULINES

Comment définir ce terme ? Quelle technique de précipitation doit-on utiliser lorsque l'on veut obtenir les « globulines » d'un sérum ?

SCHMIDT qui créa le terme « globuline » en 1862 (2) l'appliqua déjà à trois fractions différentes qu'il confondit : protéides précipitant par dilution du sérum

par de l'eau distillée, ou par de l'eau distillée acidulée par de l'acide acétique, ou par du chlorure de sodium à saturation. Or, nous avons pu vérifier que l'eau acidulée ne précipite pas une fraction identique à celle que précipite l'eau distillée non acidulée.

Les lois de la nomenclature chimique imposeraient de conserver au terme globulines sa définition première dont celle de SCHMIDT, mais cette définition est imprécise et, de plus, elle est celle qui correspond à l'une des fractions que l'on qualifie « euglobulines » depuis que l'on sait qu'il existe des protéides à poids moléculaires plus élevés que celui des albumines (SVEDBERG) (17) et pourtant solubles dans l'eau distillée. La tradition d'ailleurs est depuis longtemps parmi les biochimistes et les physicochimistes, spécialistes des protéides (SOERENSEN, LOEB, HOPKINS, ADAIR, ROBINSON, SVEDBERG, SJÖGREN, M^{me} A. ROCHE, LINDERSTROM-LANG, MACHEBOËUF, SANDOR, etc...) de définir les globulines du sérum comme le fit l'école de HOFMEISTER dès 1886 (5) : *protéides du sérum précipitant par addition au sérum d'un égal volume d'une solution saturée et neutralisée de sulfate d'ammonium* et ce ne sont plus que quelques biologistes non spécialistes de la question qui utilisent encore de-ci de-là le terme « globulines » ou même le terme « globuline » pour désigner les protéides précipitant par simple dialyse ou par simple dilution du sérum. Il est à souhaiter que tous se rangent maintenant à l'avis de la majorité et n'appellent plus « les globulines » ou « la globuline » des fractions qui ne représentent qu'une partie des protéides à haut poids moléculaire contenus dans le sérum et qu'ils obtiennent par dialyse ou par dilution.

(17) SVEDBERG et SJÖGREN B., *Journ. Amer. Chem. Soc.* 52, 2855 (1930).

Au sujet des globulines totales, donc la question semblerait résolue ou, du moins, le serait si quelques personnes insuffisamment documentées ne commettaient encore journellement une erreur de nomenclature. Cependant, M^{me} A. ROCHE (18), biochimiste très avertie, a récemment et à juste titre apporté un certain trouble dans les esprits en montrant que la concentration en sulfate d'ammonium correspondant à la demi-saturation qui sert à définir les globulines ne convient pas à tous les sérums de toutes les espèces animales car, pour certaines espèces, le palier qui sépare nettement deux fractions bien distinctes et de poids moléculaires bien différents correspond à une concentration en sulfate assez nettement supérieure à la demi-saturation. Si donc, pour ces sérums on précipite les « globulines » en ajoutant au sérum un volume égal de solution saturée et neutre de sulfate d'ammonium, on précipite bien la majeure partie des globulines, mais on laisse cependant en solution des protéides à poids moléculaire très élevé et égal à celui des globulines du sérum (150.000) et qui précipitent facilement par addition d'une légère quantité supplémentaire de sulfate d'ammonium, bien avant que la concentration en ce sel soit suffisante pour précipiter les albumines (poids moléculaire 68.000).

Pour les besoins des recherches de pathologie, de telles considérations n'ont qu'un intérêt assez secondaire, car l'erreur quantitative que l'on peut commettre en laissant ainsi en solution de très petites quantités de globulines n'est pas très importante et ce que recherchent les biologistes c'est surtout une technique présentant un caractère de généralité suffisant et une simplicité compatible avec leurs besoins et avec leurs possibilités instrumentales. Or, rien n'est plus

(18) A. ROCHE, C.R. Soc. biol. 1935

simple que d'ajouter au sérum un volume égal d'une solution saturée en sulfate d'ammonium et l'on peut considérer que, dans ces conditions, on précipite pratiquement tout ce qu'à la lumière des travaux de SVEDBERG et SJÖGREN, de MUTZENBECHER (19) et de M^{me} A. Roche (20) on doit considérer comme des globulines.

Nous devons donc considérer que seule la demi-saturation en sulfate d'ammonium doit être utilisée pour précipiter une fraction que l'on peut qualifier par le terme « les globulines ». Notons cependant que la précipitation par le sulfate de magnésium à saturation semble bien conduire à l'obtention d'une fraction à peu près identique. Notons également que le sulfate de sodium à une concentration convenable conduit peut-être, comme l'affirme HOWE (21), à l'obtention de la même fraction, mais les conditions que l'on doit respecter pour cela sont assez complexes et la réalisation de la technique de HOWE est infiniment moins simple que la précipitation des globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation ou par le sulfate de magnésium à saturation ; elle peut, entre des mains peu expertes conduire à des erreurs ; il nous semble donc que l'on doive l'abandonner pour les usages médicaux.

Il nous restait à préciser les erreurs qui pouvaient provenir, lors de la séparation des « globulines » par le sulfate d'ammonium, de la souillure du précipité par des albumines entraînées au cours de la précipitation. Pour cela, nous avons comparé les résultats obtenus par la technique N° II à ceux obtenus par la technique N° I. La technique N° II, en effet, ne diffère

(19) MUTZENBECHER (P. von), *Biochem. Zeitschr.* 266, 226 (1933).

(20) M^{me} A. ROCHE, *Bulletin de la Soc. Chim. biol.* 17, 704 (1935).

(21) HOWE, *Journ. of Physiol.* 29, proceedings p. xxvi (1903).

de la technique N° 1 que par une répétition de la précipitation des globulines ayant pour but de leur enlever la majeure partie des albumines qui les souillent lorsqu'elles ont subi une seule précipitation par le sulfate d'ammonium.

Nos résultats montrent que l'erreur causée par l'entraînement d'albumines n'est pas considérable ; elle atteint seulement 2 pour 100 dans le cas du sérum N° 2, et 9 pour 100 dans le cas du sérum N° 1.

On pourrait être surpris d'une telle différence entre les importances des erreurs constatées pour ces deux sérums, mais nous devons préciser que divers essais préliminaires nous avaient amené à penser que la quantité d'albumines entraînées par les globulines était fonction de la durée du contact entre les globulines et leurs eaux mères.

Si l'on recueille les globulines aussitôt après leur précipitation par le sulfate d'ammonium, le précipité contient une quantité assez importante d'albumine (cas du sérum N° 1). Si, au contraire, on ne recueille les globulines qu'après les avoir énergiquement agitées pendant une demi-heure avec leur solution mère (cas du sérum N° 2), le précipité ne contient plus que de très faibles quantités d'albumines. Comment expliquer ce fait ? Lorsque l'on ajoute au sérum la solution saturée de sulfate d'ammonium, au point où tombent les gouttes de cette solution, la concentration en sulfate est très élevée et des albumines précipitent puisque, on le sait, ces protéides précipitent lorsque la concentration en sulfate d'ammonium est très élevée.

Si l'on centrifuge le précipité aussitôt après une brève agitation, les albumines précipitées ne sont pas entièrement remises en solution, l'équilibre n'est pas

atteint ; si, au contraire, on agite longuement, les albumines précipitées se remettent en solution dans le liquide demi-saturé en sulfate d'ammonium et le précipité n'est plus souillé que par de très petites quantités d'albumines contenues dans le liquide qui l'imbibe.

Pour les besoins de la clinique une erreur de deux pour cent dans la détermination des globulines est négligeable. Il suffit donc, lorsque l'on veut doser les globulines dans le sérum d'un malade d'en effectuer la séparation en ajoutant à ce sérum un égal volume de solution saturée neutralisée de sulfate d'ammonium, puis d'agiter pendant une dizaine de minutes et d'attendre une demi-heure en agitant de temps en temps avant de recueillir les globulines par centrifugation énergique. Les globulines recueillies devront être séparées du liquide surnageant par un égouttage soigneux puis les protéides contenus dans le précipité seront dosés par pesée après coagulation à l'alcool bouillant, lavage à l'alcool bouillant, puis lavage à l'eau tiède et dessiccation. Il n'est pas nécessaire, lorsque l'on veut seulement doser les globulines et non les lipides, de parfaire plus complètement l'enlèvement des lipides, car après les deux lavages à l'alcool chaud que nous préconisons, la quantité de lipides qui souillent encore les globulines est au plus égale à 1 pour cent des globulines; l'erreur est négligeable pour les besoins cliniques.

Si, par contre, on désire obtenir un dosage plus rigoureux des globulines il faut, comme nous le fîmes dans la technique N° II, pratiquer une seconde précipitation des globulines pour mieux leur enlever les albumines et traiter ensuite le coagulum non seulement par de l'alcool, mais aussi par de l'éther pour mieux en enlever les lipides.

2° EUGLOBULINES

Le problème que nous envisageons est beaucoup plus complexe dans le cas des *euglobulines* que dans le cas des globulines.

Que doit-on considérer comme véritables euglobulines ? les protéides précipitant par dilution du sérum ou bien ceux précipitant par dialyse directe du sérum, ou bien ceux précipitant par dialyse de la solution des globulines préalablement séparées du sérum par le sulfate d'ammonium à demi-saturation ou bien enfin les protéides précipitant par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation ? Nos résultats expérimentaux montrent que, suivant celle de ces quatre définitions que l'on adopte, le résultat obtenu pour un même sérum peut varier de 2,4 à 36,6 (l'erreur relative peut donc atteindre 1.700 pour 100).

Ce fut MARCUS EMIL qui, en 1899, créa le terme « euglobulines » (7) ; il l'appliqua aux protéides qui précipitent par dialyse directe du sérum tandis qu'il créait le terme de « pseudoglobulines » pour désigner la fraction protéidique qui après enlèvement des euglobulines par dialyse, précipité par addition de sulfate d'ammonium en quantité correspondant à la demi-saturation en ce sel.

Les règles habituelles de la nomenclature chimique nous obligent à conserver le terme « euglobulines » pour dénommer la fraction à laquelle il fut appliqué lors de sa création, c'est-à-dire aux protéides précipitant par dialyse directe du sérum.

Mais nos expériences démontrent clairement qu'il faut à tout prix éviter d'appeler « euglobulines » la fraction qui précipite par simple dilution du sérum au moyen de 9 volumes d'eau distillée. Si, en effet, il se peut que certains protéides soient communs à cette

fraction et aux « euglobulines » proprement dites, on constate facilement que la simple dilution du sérum au dixième ne conduit qu'à l'obtention d'une fraction pesant seulement la moitié environ de ce que pèsent les « euglobulines » proprement dites. La dilution du sérum au dixième par de l'eau distillée et la dialyse du sérum qui cependant ont pour but l'une et l'autre de faire baisser la concentration en électrolytes et, par suite, de précipiter les protéides insolubles en absence d'électrolytes, ne sont pas équivalentes. A quoi peut-on imputer ce défaut de concordance entre deux techniques qui, à première vue, semblaient devoir conduire à des résultats à peu près identiques?

Une première hypothèse nous sembla logique :

Lorsque l'on dilue le sérum au dixième par de l'eau distillée, on n'abaisse pas autant la teneur du liquide en électrolytes que ne le fait une dialyse poursuivie pendant 5 jours contre de l'eau distillée renouvelée une douzaine de fois. Il se pouvait donc que la concentration saline après dilution au dixième soit encore suffisante pour maintenir en solution certains protéides qui précipitent au cours de la dialyse lorsque les électrolytes sont mieux éliminés.

Pour essayer de vérifier ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons effectué l'expérience suivante :

Nous avons placé des euglobulines proprement dites (obtenues par dialyse d'un sérum) en présence d'une solution de chlorure de sodium à 0,9 p. 1.000, c'est-à-dire ayant une concentration en électrolytes pratiquement égale à celle qui se rencontre dans le mélange obtenu en diluant du sérum au dixième par de l'eau distillée. Nous avons constaté qu'il ne se dissolvait pas de quantité notable des euglobulines. Ce n'est donc pas à une solubilité partielle des euglobu-

lines en présence des électrolytes à faible concentration qui suffit à expliquer les résultats insuffisamment élevés que l'on obtient pour les euglobulines lorsque leur précipitation est simplement effectuée par dilution du sérum au dixième.

Nous avons alors pensé que lorsque l'on dilue un sérum, le PH qui était avant dilution au voisinage de 7,6 n'est pas notablement abaissé par dilution car les tampons contenus dans le sérum maintiennent le PH au dessus de 7.

Si, au contraire, on soumet un sérum à une dialyse prolongée contre de l'eau distillée renouvelée, le PH du sérum s'abaisse progressivement au fur et à mesure du départ des électrolytes pour tendre asymptotiquement vers le point isoionique moyen des protéides du sérum qui est, on le sait (22) entre 5,2 isoionique des albumines et 6,0 isoionique des globulines donc voisin de 5,5 par exemple. La dialyse ne provoque donc pas seulement le départ des électrolytes, mais aussi une nette acidification et c'est cette double action qui intervient pour précipiter la fraction qui constitue les « euglobulines » proprement dites. La simple dilution du sérum au dixième ne suffit pas à provoquer la précipitation quantitative de cette fraction surtout parce que le PH ne s'abaisse pas assez au cours de cette dilution. Il est possible qu'en combinant la dilution avec une acidification convenable, vers PH 5,2 on parvienne à précipiter la même fraction que par dialyse, mais une longue étude serait à faire pour mettre une telle technique au point et surtout pour vérifier si la fraction obtenue correspond quantitativement et aussi qualitativement avec les euglobulines proprement dites. Tant qu'une telle étude

(22), Conférer à ce sujet G. SANDOR, Point isoionique des protéides du sérum, *Bull. Soc. Chim. biol.* (1936).

n'aura pas été réalisée, la technique par dilution ne doit pas être utilisée pour séparer une fraction qualifiée « les euglobulines ». Les auteurs qui désirent opérer par simple dilution doivent dénommer autrement la fraction qu'ils obtiennent. Ils peuvent, par exemple, l'appeler « euglobulines de dilution » ou « diluglobulines », mais pas « euglobulines », car s'il est vraisemblable que cette fraction est une partie des euglobulines, elle ne contient sûrement pas toutes les euglobulines proprement dites.

Que penser maintenant de la technique N° III qui correspond à la définition du terme « euglobulines » donnée par PORGES, SPIRO et FULD : *Protéides précipitant par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation*? C'est seulement en 1903 que ces auteurs donnèrent cette définition (8 et 9), donc longtemps après que MARCUS EMIL eut en 1899 créé le terme euglobulines pour désigner les protéides qui précipitent par dialyse du sérum. Puisque, comme le montrent nos résultats, les « euglobulines » de PORGES, SPIRO et FULD n'ont aucun rapport quantitatif avec les euglobulines proprement dites de MARCUS EMIL, le terme euglobulines ne peut, en aucun cas, leur être attribué.

Bien plus, si l'on se réfère au résultat obtenu par la technique N° VII, on peut conclure que le précipité qualifié « euglobulines » par PORGES, SPIRO et FULD et obtenu par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation, ne peut même pas servir à obtenir, par dialyse secondaire, les euglobulines proprement dites. Si, en effet, on soumet cette fraction à la dialyse, on voit apparaître un précipité beaucoup plus abondant que le précipité que l'on obtient en dialysant directement le sérum. (Pour le sérum N° 2 on obtient 5, 2 gr. au lieu de 2, 4.)

Ce fait est fort curieux. Comment se fait-il, en effet,

que l'on obtienne plus de protéides insolubles dans l'eau en l'absence d'électrolytes si l'on soumet seulement à la dialyse une fraction des protéides du sérum que si l'on soumet à une semblable dialyse la totalité du sérum? Un fait analogue, bien plus évident encore apparaît en comparant les résultats que nous avons obtenus pour les techniques VI et V; nous y reviendrons, mais concluons dès maintenant que ce que PORGES, SPIRO et FULD, puis bien d'autres auteurs à leur suite, appellent « euglobulines » et qu'ils précipitent par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation, n'a rien de commun avec les « euglobulines » proprement dites qui précipitent par dialyse du sérum. La fraction de PORGES, SPIRO et FULD contient peut-être la majeure partie des euglobulines, mais elle contient beaucoup d'autres protéides et elle donne même par dialyse plus de protéides insolubles dans l'eau distillée que n'en fournit le sérum lui même.

Le terme « les euglobulines » ne doit donc plus être utilisé pour qualifier la fraction précipitant du sérum par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation. Les auteurs qui veulent encore utiliser, pour des buts immunologiques ou autres, la précipitation par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation, doivent appeler la fraction qu'ils obtiennent « globulines de SPIRO, PORGES et FULD » ou bien encore « globulines précipitables au tiers de saturation en sulfate d'ammonium ».

Un fait fort intéressant nous est apparu au cours de l'étude de la fraction de SPIRO, PORGE et FULD : La dialyse de cette fraction conduit, nous l'avons vu, à l'obtention d'une plus grande quantité de protéides insolubles dans l'eau distillée que la dialyse directe du sérum total. Ce fait pouvait paraître paradoxal : Si, en effet, on admettait que l'insolubilité dans l'eau en l'absence d'électrolytes caractérisait une fraction

protéidique, les « euglobulines proprement dites », comment expliquer que l'on trouve moins de cette fraction dans le tout représenté par le sérum lui-même que dans une partie seulement de ce tout, c'est-à-dire dans la fraction précipitant du sérum au tiers de saturation en sulfate d'ammonium? Un fait analogue mais plus net encore apparaît lorsque l'on soumet à la dialyse l'ensemble des « globulines » obtenues suivant HOFMEISTER par le sulfate d'ammonium à demi-saturation (Technique VI). La dialyse de cette fraction des protéides du sérum conduit à l'obtention d'une vingtaine de grammes de protéides précipités par dialyse à partir d'un litre de sérum, tandis que la dialyse directe de ce même litre de sérum conduit seulement à l'obtention de 2 à 6 grammes d'euglobulines proprement dites.

La différence est considérable et pourtant la dialyse fut toujours conduite dans des conditions rigoureusement comparables. Que devons-nous conclure?

1° *La précipitation par dialyse ne suffit pas à caractériser une fraction protéidique définie puisque, suivant que cette dialyse est pratiquée sur le sérum total (Technique V) ou sur une fraction des protéides de ce sérum (Techniques VI et VII), le résultat obtenu diffère considérablement.*

2° Pour expliquer que la dialyse des seules globulines conduise à obtenir beaucoup plus de protéides insolubles dans l'eau que la dialyse du sérum total, on peut formuler diverses hypothèses :

a) Il se peut que l'action du sulfate d'ammonium à demi-saturation dénature partiellement les globulines en modifiant leurs propriétés de solubilité. Cette dénaturation rendrait insoluble dans l'eau distillée une partie des globulines qui, préalablement, y étaient

solubles. Le sulfate d'ammonium transformerait ainsi en quelque sorte, par dénaturation, des pseudo-globulines en euglobulines ou, tout au moins, en substances qui étant comme les euglobulines insolubles dans l'eau distillée précipiteraient par dialyse.

b) Toutes les globulines insolubles dans l'eau distillée que l'on obtient par dialyse des globulines pré-existeraient bien dans le sérum, mais la dialyse directe du sérum total ne provoquerait pas leur précipitation par suite de la présence dans le sérum des albumines qui maintiendraient en solution dans l'eau distillée ces substances insolubles, tout comme d'ailleurs les électrolytes peuvent les maintenir en solution dans l'eau.

c) Euglobulines obtenues par dialyse directe du sérum et précipité obtenu par dialyse des globulines ne seraient les unes et les autres que des artéfacts que créerait la dialyse aux dépens des protéides du sérum en les dénaturant. La dénaturation par dialyse évoluerait différemment suivant les conditions de la dialyse et, en particulier, suivant que cette dialyse porterait sur l'ensemble des protéides du sérum ou seulement sur une partie de ces protéides : les globulines préalablement isolées sous l'action d'un sel neutre à concentration convenable. Cette théorie semble la plus probable car elle est étayée par des constatations extrêmement intéressantes faites par SVEDBERG et SJÖGREN (23). Ces auteurs ont étudié les poids moléculaires des protéides en déterminant la vitesse de sédimentation de leurs molécules par centrifugation à vitesse considérable, dans des conditions déterminées. En opérant sur le sérum lui-même, ils ont

(23) SVEDBERG Th. et SJÖGREN B., *Journ. of Amer. Chem. Soc.* 50, 3318 (1928) et 52, 2855 (1930), et MUTZENBECHER, *Biochem. Zeitsch.* 266, 226 (1933). Travail effectué sous la direction de SVEDBERG).

constaté qu'il existait à peu près uniquement dans le sérum deux types de molécules protéidiques, l'une correspondant aux albumines et ayant un poids moléculaire de 68.000 environ, l'autre, correspondant aux globulines et ayant un poids moléculaire de 150.000 (sérum de cheval). Si, au contraire, on applique la même technique de détermination du poids moléculaire à des « euglobulines » et à des « pseudoglobulines » séparées par dialyse des globulines totales (comme dans notre technique N° VI), on trouve 50.000 à 100.000 pour les pseudoglobulines et les chiffres très abhéquents pour les euglobulines.

Pour ces mêmes euglobulines, M^{me} ROCHE (24), par une autre technique (osmose) trouve un poids moléculaire variant de 135.000 à 190.000. Il semble bien que de telles molécules n'existaient pas dans le sérum lui-même, puisque l'ultracentrifugation n'y montrait la présence en quantités importantes que de deux types de molécules bien distincts (68.000 et 150.000). SVEDBERG et SJÖGREN pensent donc que les « euglobulines » et les « pseudoglobulines » qu'ils étudient ne sont pas des protéides définis mais des produits de transformation non homogènes de la globuline totale du sérum. Notons cependant que SVEDBERG et SJÖGREN ont étudié sous le nom d'euglobulines une fraction préparée comme dans notre technique N° VI, c'est-à-dire par dialyse de globulines totales préalablement séparées du sérum par le sulfate d'ammonium et non des euglobulines proprement dites obtenues par dialyse directe du sérum. Or, il se peut très bien (première de nos hypothèses) que ce soit le sulfate d'ammonium à demi-saturation qui dénature les globulines et fasse ainsi naître d'abon-

(24) ROCHE (M^{me} A.), *Bull. Soc. Chim. biol.* 16, 1479 (1934), et 17, 704 (1935).

dantes fractions précipitables par dialyse qui se trouvaient réunies avec les petites quantités d'euglobulines proprement dites dans les fractions étudiées par SVEDBERG et SJÖGREN et par M^{me} ROCHE. L'étude devrait être reprise sur des euglobulines proprement dites obtenues par dialyse directe du sérum, mais les recherches, basées sur l'ultracentrifugation, nécessitent un matériel fort onéreux que nous n'avons pas à notre disposition. En résumé, on ne sait pas encore si les euglobulines proprement dites ne sont pas une fraction réellement distincte constituée par des protéides particuliers préexistant dans le sérum ou si, comme les autres protéides insolubles dans l'eau distillée que l'on peut obtenir en soumettant secondaiement les globulines à la dialyse, elles ne sont pas tout simplement un artéfact naissant par dénaturation des globulines du sérum.

Un travail récent de MACHEBŒUF et TAYEAU (25) est venu apporter quelques clartés à ce sujet. Ces auteurs, en effet, ont montré que le caractère d'être insolubles dans l'eau distillée que possèdent certaines fractions des globulines, disparaît si l'on enlève à ces fractions les lipides qui étaient accolés aux protéides. On peut donc penser avec SORENSEN (26) et avec MACHEBŒUF et SANDOR (27) que les globulines dans le sérum sont des ensembles dissociables de constituants plus simples. Parmi ces constituants, la plupart seraient des protéides plus simples, d'autres

(25) MACHEBŒUF (M.) et TAYEAU (F.), *Comptes Rendus Société Biologie* (1938), 126, p. 1181 et p. 1183, et 3^e note sous presse.

(26) SORENSEN (S.P.L.), *Comptes rendus Laborat. Carlsberg*, 18, N°5, I (1930).

(27) MACHEBŒUF (M.), 1 vol. 1937, Hermann, éditeur à Paris : *L'état des lipides de la matière vivante*; et MACHEBŒUF et SANDOR, divers mémoires au *Bulletin Soc. Chim. Biol.*, 1931 et 1932, et thèse de Doctorat ès-sciences de SANDOR, Paris 1934.

constituants seraient des lipides et l'action des sels neutres concentrés et de la dialyse ou de la dilution du sérum dissocierait irréversiblement cet ensemble en fragments plus petits; certains de ces fragments seraient insolubles dans l'eau distillée; ce seraient les euglobulines proprement dites lorsque la dialyse aurait porté sur le sérum entier, ce seraient toutes les diverses fractions différentes que l'on qualifia également d'euglobulines lorsque la dialyse porterait sur des globulines déjà traitées par des sels concentrés. La dissociation ne se faisant pas de la même façon suivant les conditions où elle s'opère (en présence de sels concentrés ou par simple dialyse), les proportions de fractions insolubles dans l'eau diffèrent considérablement suivant la technique mise en œuvre. D'ailleurs, l'insolubilité dans l'eau n'est pas un caractère propre aux fragments protéidiques eux-mêmes, puisqu'elle est fonction des lipides qui leur sont accrochés (MACHEBOEUF et TAYEAU).

Après avoir ainsi conclu, nous devrions dénier tout intérêt aux études quantitatives effectuées dans un but médical sur les « euglobulines », mais un fait demeure : Dans certaines affections telles que le Kala-Azar et le paludisme, les fractions euglobuliniques que l'on obtient par les diverses méthodes, sont beaucoup plus abondantes que les fractions homologues obtenues par les mêmes méthodes en partant de sérums d'individus normaux. Un fait clinique intéressant pouvant être utilisé pour étayer des diagnostics hésitants est donc à considérer. Nous avons vu, d'autre part, que les propriétés antitoxiques des sérums antidiphthériques appartiennent aux globulines qui ne précipitent pas par dialyse; voilà un autre fait intéressant qui incite à poursuivre l'étude quantitative des fractions euglobuliniques. Il faut donc souhaiter que tous ceux qui, à l'avenir, étudieront les euglobu-

lines, voudront bien ne qualifier ainsi que les « euglobulines proprement dites », c'est-à-dire celles précipitant par dialyse directe du sérum. A toutes les autres fractions insolubles dans l'eau distillée, mais plus ou moins bien définies que l'on pourra isoler du sérum; on devra attribuer un nom différent de « euglobulines » et dire par exemple « fraction globulinique insolubilisée dans telle condition » ou désigner ces fractions par des lettres ou par des numéros d'ordre.

Il est malheureux d'ailleurs que de très nombreux auteurs parmi les plus grands spécialistes des études sur les protéides aient employé le terme « euglobulines » pour désigner les fractions obtenues suivant des techniques comparables à notre technique N° VI, c'est-à-dire en soumettant secondairement au fractionnement les globulines totales préalablement séparées par un sulfate en solution concentrée (SORENSEN, SVEDBERG, M^{me} ROCHE, MACHEBOEUF, SANDOR, etc...). Peut-être pourrait-on, pour éviter des confusions nouvelles pour ceux qui devront se reporter aux travaux fondamentaux de ces auteurs, continuer à appeler euglobulines ce qu'ils désignent ainsi, mais il faudrait alors changer la définition originale du terme « euglobulines » de MARCUS EMIL et créer pour la fraction qui précipite par dialyse directe du sérum une dénomination nouvelle. *Marcuseuglobulines*, par exemple. Mais une commission de nomenclature des protéides du sérum vient d'être créée par la Société de Chimie biologique (1); nous espérons que notre modeste contribution à l'étude de cette question pourra être utile à ses travaux et c'est à cette commission que revient le rôle de choisir les termes qui devront être utilisés pour

(1) Les membres de cette commission sont MM. les Professeurs POLONOVSKI, MACHEBOEUF et FLEURY, et MM. GUILLAUMIN et LAUDAT.

dénommer chacune des fractions protéïdiques du sérum et de proposer les techniques standardisées les plus convenables que devront utiliser les biologistes pour déterminer leurs teneurs dans les sérums des malades.

CONSIDÉRATIONS SUR LES LIPIDES QUI ACCOMPAGNENT LES DIVERSES FRACTIONS PROTÉÏDIQUES QUE L'ON PEUT SÉPARER A PARTIR DU SÉRUM

On sait que depuis les travaux de HAMMARSTEN (29), de HARDY (30), de HASLAM (31), de HANDOWSKY et WAGNER (32), de SOERENSEN (33), de THÉORELL (34), de TROENSEGAARD et KOUDAH (35), de M^{me} H. CHICK (36), de MACHEBOËUF (37) et de divers autres auteurs (36), que les précipités protéïdiques que l'on peut obtenir en partant de sérum sanguin contiennent des substances lipoïdiques diverses.

(29) HAMMARSTEN (O.), *Ergebnisse. de Physiologie*, 1, 330 (1902).

(30) HARDY (W.B), *Journ. of Physiol.* 33, 251 (1905).

(31) HASLAM (H.C.), *Biochem. Journ.* 7, 492 (1913).

(32) HANDOWSKY et WAGNER, *Biochem. Zeitschr.* 31, 32 (1911).

(33) SOERENSEN (S.P.L.), *Comptes rendus Lar. Carlsberg*, 16, N° 8, 1 (1925).

(34) THEORELL, *Biochem. Zeitschr.* 175, 297 (1926).

(35) TROENSEGAARD et KOUDAH, *Zeitschr f. physiol. Chem.* 153, 111 (1926).

(36) CHICK (H.), *Biochem. journal* 8, 404 (1914).

(37) MACHEBOËUF (M.A.), *Bull. Soc. Chim. biol.* 11, 270 (1929); 11, 485 (1929), et 19, 694 (1937).

(38) Une bibliographie détaillée se rapportant à ce sujet se trouve dans la monographie de MACHEBOËUF éditée en 1937 par Hermann et C° : *L'état des lipides de la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique.*

Les travaux de MACHEBOEUF et de ses élèves (SANDOR, WAHL, DELAGE, JANUSZKIEWICZ, TAYEAU) (39), ont montré que ces substances lipoidiques sont unies aux protéides pour former des cénapses lipidoprotéidiques dans lesquelles lipides et protéides voient leurs propriétés et, en particulier, leurs caractères de solubilité profondément modifiés. La précipitation des lipides avec les protéides du sérum par les sels ou par dialyse est réversible et si l'on remet en solution les fractions protéidiques, les lipides se dissolvent également, si bien qu'il est impossible d'arracher les lipides aux protéides sans faire subir à ces protéides des traitements particuliers et assez énergiques (traitement par alcool et éther ou par éther et savons à PH convenable par exemple). Toutes les fractions que l'on désigne par les termes globulines, albumines, euglobulines, pseudoglobulines, etc., que nous avons envisagées ci-dessus contiennent des lipides et nous avons cherché à savoir l'importance de l'erreur qui résulterait de la pesée directe de ces fractions si on n'enlevait pas les lipides. De nombreux auteurs, en effet, n'ont pas tenu compte des lipides dans leurs dosages de protéides. Cette étude nous permettait, en outre, de préciser par un essai effectué sur un même sérum de cheval, les proportions relatives de lipides contenues dans les diverses fractions globuliniques que nous avons envisagées.

Or, MACHEBOEUF et TAYEAU (40) ont récemment démontré que les caractères de solubilité de certaines fractions globuliniques étaient conditionnées par les

(39) MACHEBOEUF (M). — Les travaux de MACHEBOEUF et de ses collaborateurs sur ce sujet ont été publiés en une série de mémoires au *Bulletin de la Société de Chimie Biologique* entre 1929 et 1937. Ils sont résumés dans la monographie de MACHEBOEUF citée ci-dessus.

(40) MACHEBOEUF et TAYEAU, *Comptes rendus de la Société de Biologie* (1929), 127, sous presse.

lipides qui leur étaient accolés. Les résultats expérimentaux que nous rapportons ci-dessus (page 43) montrent que l'erreur due aux lipides lors de la pesée des fractions protéidiques peut atteindre pour du sérum normal de cheval 12 pour 100 (Technique N° III pour le sérum N° I) et même 24 pour 100 (Technique N° IV pour le sérum N° I). De telles erreurs sont donc considérables même pour les sérums de chevaux normaux que nous avons étudiés. Pour des sérums humains, les erreurs sont de même ordre et lorsque l'on s'adresse à certains sérums pathologiques, elles peuvent être beaucoup plus considérables encore comme l'ont déjà noté MACHEBŒUF et WAHL (41) au cours de leurs études sur la néphrose lipoïdique. Ces auteurs, en effet, ont trouvé dans les albumines des sérums de ces malades, des quantités de lipides pouvant être presque égales aux quantités de protéïdes présentes (jusqu'à 90 de lipides pour 100 de protéïdes).

Un fait intéressant se dégage à ce sujet de nos expériences : Si l'on compare les résultats que nous avons obtenus pour un même sérum (sérum N° I) par les techniques IV et V, on constate que les « euglobulines » selon PANUM, obtenues par simple dilution du sérum (technique IV), bien que moins abondantes que les « euglobulines proprement dites » obtenues selon MARCUS EMIL par dialyse directe du sérum (technique V) contiennent beaucoup plus de lipides. Ceci prouve, une fois de plus, que les fractions que l'on obtient par deux techniques qui pouvaient paraître comparables et auxquelles on a attribué la même dénomination (euglobulines) diffèrent non seulement par leur masse mais aussi par leur constitution. Ce fait

(41) MACHEBŒUF (M.) et WAHL (R.), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 13, 486, 504, 511, 736 et 745 (1931).

Citons à ce sujet à titre d'exemple l'un des cas de néphrose lipoïdique publiés par Machebœuf et Wahl, le précipité d'albumine de ce sérum contenait 28 gr. de protéïdes et 31 gr. de lipides.

est d'ailleurs à rapprocher de celui mis en évidence par MACHEBOEUF et TAYEAU, c'est-à-dire du rôle des lipides dans la détermination des caractères de solubilité des fractions qui précipitent par dialyse.

Notons en terminant cette brève étude sur les substances lipoïdiques du sérum que toutes les fractions que nous avons pu isoler du sérum contiennent, sans exception, des quantités très notables de lipides, la moins riche en lipides (globulines totales du sérum N° 2) contenait encore plus de 4 pour cent de lipides.

Nous n'avons pas fait figurer dans le tableau de nos résultats (page 43), les chiffres que nous avons obtenus pour les albumines et pour les cénapses lipidoprotéïdiques acidoprécipitables de MACHEBOEUF, mais nous les donnerons ici pour montrer que dans le cas des albumines, la richesse en substances lipoïdiques est également très élevée.

Sérum de cheval N° 3

Poids d'albumines par litre de sérum: 55,2 gr.

Substances lipoïdiques accompagnant ces albumines : 5,2 gr.

Poids des protéïdes des cénapses acidoprécipitables isolées de ces albumines (par litre de sérum): 1,20 gr.

Poids des lipides contenus dans ces cénapses: 0,9 gr.

Concluons donc de nos essais sur les lipides que toutes les fractions protéïdiques que l'on peut isoler du sérum sont riches en substances lipoïdiques qu'il faut éliminer avec soin avant de peser les protéïdes, faute de quoi les résultats seraient entachés d'erreurs considérables pouvant atteindre 25 pour 100, même dans le cas de sérums normaux, même lorsqu'il s'agit de simples fractions protéïdiques et non de fractions lipidoprotéïdiques spécialement préparées.

RÉSUMÉ ET RAPPEL DES CONCLUSIONS

Le dosage des protéides totaux du sérum sanguin ne présente pas de difficulté spéciale et les résultats fournis par les divers auteurs concordent. Il n'en est plus ainsi lorsqu'il s'agit des diverses fractions protéidiques que l'on peut séparer du sérum. Si l'on compare, en effet, les résultats contenus dans les divers articles traitant des variations pathologique, des *globulines*, des *albumines*, des *euglobulines* et des *pseudoglobulines*, on est frappé par l'incohérence complète des chiffres. Ce sont les définitions mêmes de ces diverses fractions qui ne sont pas univoques.

Les définitions des fractions étant simplement basées sur leurs caractères de solubilité et les caractères choisis pour définir chacune des fractions par les divers auteurs n'étant pas les mêmes, les définitions ne pouvaient être concordantes que si plusieurs caractères différents pouvaient caractériser une seule et même fraction. Un même terme « euglobulines » par exemple était appliqué à 5 fractions différentes obtenues par 5 techniques différentes basées sur 5 caractères de solubilité différents. Une telle dénomination unique ne serait valable que si chacun des 5 caractères choisis pour les cinq définitions caractérisait, chacun parfaitement, une seule et même fraction.

Il n'en est malheureusement rien et nous avons pu vérifier que si l'on isole d'un même sérum les cinq fractions que l'on voit qualifier d'un même terme « euglobulines », on obtient des fractions qui diffèrent entre elles. Les différences peuvent être considérables et le poids des fractions peut varier dans le rapport de 1 à 15 par exemple.

Nous basant sur une étude historique de l'origine de chacun des termes globulines, euglobulines et

pseudoglobulines, puis sur une étude expérimentale des diverses techniques de séparation des diverses fractions qualifiées par une même dénomination, nous avons été conduit à choisir pour chacun des termes globulines, euglobulines, pseudoglobulines et albumines, une définition qui, seule, nous paraît valable. Il serait à souhaiter que toutes les autres définitions soient abandonnées, car elles ont conduit à une confusion regrettable.

Voici les définitions dont nous proposons l'emploi:

GLOBULINES DE SERUM

Protéides précipitant lorsque l'on ajoute au sérum un égal volume d'une solution saturée et préalablement neutralisée de sulfate d'ammonium.

EUGLOBULINES

Protéides précipitant lorsque l'on soumet le sérum à une dialyse prolongée vis-à-vis d'eau distillée refroidie et fréquemment renouvelée.

PSEUDOGLOBULINES

Protéides qui, après élimination des euglobulines par dialyse, précipitent, lorsque l'on ajoute au liquide un égal volume d'une solution saturée et neutralisée de sulfate d'ammonium.

ALBUMINES

Protéides qui restent en solution lorsque l'on ajoute au sérum un égal volume de solution saturée et neutralisée de sulfate d'ammonium, mais qui précipitent lorsque l'on sature le sérum au moyen de sulfate d'ammonium.

Par contre, d'autres définitions telles que les suivantes, sont à rejeter définitivement, car elles sont chronologiquement postérieures à celles qui précèdent et ne sont pas équivalentes :

A rejeter pour les globulines la définition suivante:

Protéides précipitant par dilution du sérum au moyen d'eau distillée ou au moyen d'eau légèrement acidulée.

A rejeter pour les euglobulines les définitions suivantes :

a) Protéines précipitant par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation.

b) Protéides précipitant par dilution du sérum au moyen de 10 volumes d'eau distillée.

c) Protéides précipitant lorsque l'on soumet à une dialyse prolongée les globulines préalablement précipitées par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. Cette définition a malheureusement servi de base à de nombreux et fort intéressants travaux et comme la fraction qui correspond à cette définition, bien que très différente des euglobulines proprement dites, est bien caractérisée, on devrait créer un terme nouveau pour la désigner.

Nous avons complété notre étude des fractions protéidiques du sérum en déterminant pour chacune d'elles la quantité de lipides qui lui était accolée. Nous avons ainsi pu apprécier l'importance des erreurs qui peuvent découler, lors du dosage de ces fractions, du fait de négliger d'enlever ces lipides avant de peser les protéides. Ces erreurs sont toujours importantes; elles peuvent atteindre 25 pour 100 pour certaines fractions, même lorsqu'il s'agit de sérums normaux.

Vu :
Le Doyen,
PIERRE MAURIAC

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
MACHEBCEUF.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 28 Mars 1939.
Le Recteur de l'Académie,

